

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FAKULTA PŘÍRODOVĚDECKÁ
KATEDRA BIOCHEMIE



Bakalářská práce

**Molekulární mechanismy indukce programované
buněčné smrti v nádorových buňkách**

Molecular mechanisms of apoptosis induction in cancer cells

Tereza Fenclová

Školitel: *RNDr. Petr Novák, Ph.D.*

Konzultant: *Mgr. Karel Vališ, Ph.D.*

PRAHA, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Petra Nováka, Ph.D. a konzultanta Mgr. Karla Valíše, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Tereza Fenclová

Abstrakt

Nádorová onemocnění jsou v dnešní době třetí nejčastější příčinou úmrtí (20 % všech úmrtí). Proto je důležité najít nové způsoby jak nádorové buňky účinně a specificky likvidovat a nejslibnější cestou je cílená terapie. Jedním z nejčastěji deregulovaných protoonkogenů v nádorových buňkách je *C-MYC*, což ho předurčuje jako efektivní cíl léčby. Vývoj takovýchto cílených účinných látek je ale velmi nákladný, proto jsou v této práci zkoumány přírodní látky, které byly používány pro léčbu nádorových onemocnění už ve starověké Číně. V této práci jsou zkoumány látky shikonin, cnicin a artemisinin. Výsledky ukazují, že shikonin indukuje apoptosu nádorových buněk cestou snížení exprese *C-MYC* a aktivací tumor supresorové MST1 kinasy. Cnicin také snižuje expresi *C-MYC*, ale MST1 aktivuje pouze slabě. Artemisinin, na druhou stranu, expresi *C-MYC* zvyšuje a MST1 neaktivuje, indukuje tedy apoptosu nádorových buněk zcela jiným mechanismem.

Klíčová slova: programovaná buněčná smrt, protinádorová terapie, signální dráhy

Abstract

Cancer diseases are now the third leading cause of death (20% of all deaths). It is therefore important to find new ways of getting tumor cells effectively and specifically disposed of and a promising path is targeted therapy. One of the most frequently deregulated protooncogenes in cancer is *C-MYC*, which makes it suitable as an effective target for treatment. However, the development of such targeted active ingredients is very expensive, so in this thesis we investigate natural substances that have been used for the treatment of cancer in ancient China. We examined the substances shikonin, cnicin and artemisinin. The results show that shikonin induces apoptosis of tumor cells by reducing the expression of *C-MYC* and activating tumor suppressor kinase MST1. Cnicin reduces the expression of *C-MYC* as well, but activates MST1 only weakly. Artemisinin, on the other hand, increases expression of *C-MYC* and doesn't activate MST1, thus operates on inducing apoptosis of tumor cells by a completely different mechanism. (In Czech)

Keywords: apoptosis, cancer treatment, signaling pathways

Obsah

OBSAH	4
SEZNAM ZKRATEK	5
1. TEORETICKÝ ÚVOD	7
1.1 APOPTOSA	7
1.1.1 Dráhy indukce apoptosy	8
1.2 ROLE BUNĚČNÉ SIGNALIZACE V TUMORGENEZI	12
1.2.1 PI3K/AKT/FOXO	12
1.2.2 Ras/Raf/MEK/ERK	15
1.2.3 Hippo dráha	17
1.2.4 JNK/p38 dráha	19
1.3 METABOLICKÉ PŘEPROGRAMOVÁNÍ NÁDOROVÝCH BUNĚK	20
1.3.1 MYC	20
1.3.2 Warburgův jev	22
1.4 PŘÍRODNÍ LÁTKY JAKO INDUKTORY APOPTOSY NÁDOROVÝCH BUNĚK	23
1.4.1 Shikonin	23
1.4.2 Cnicin	25
1.4.3 Artemisinin	26
2. CÍL PRÁCE	27
3. MATERIÁL A METODY	28
3.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	28
3.1.1 Přístroje	28
3.1.2 Materiál	28
3.1.3 Chemikálie	29
3.2 METODY	30
3.2.1 Kultivace buněk	30
3.2.2 Izolace RNA	31
3.2.3 Izolace proteinů	31
3.2.4 Kvantifikace RNA	31
3.2.5 Kvantifikace proteinů	31
3.2.6 Reverzní transkripce	32
3.2.7 Kvantitativní PCR	32
3.2.8 SDS elektroforéza	34
3.2.9 Přenos a imunodetekce proteinů	34
4. VÝSLEDKY	35
4.1 VLIV SHIKONINU NA EXPRESI VYBRANÝCH GENŮ	35
4.2 VLIV DALŠÍCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA EXPRESI VYBRANÝCH GENŮ	36
4.3 AKTIVACE HIPPO DRÁHY PŘÍRODNÍMI LÁTKAMI	39
5. DISKUZE	39
6. ZÁVĚR	41
CITOVANÁ LITERATURA	41

Seznam zkratek

AIF	faktor indukující apoptosu nezávislou na kaspasách (Apoptosis-inducing factor)
AKT	serin/threoninová protein kinasa B
ANT-VDAC-PTP komplex:	
	ANT – ATP/ADP transportér
	VDAC – napěťově řízený iontový kanál
	PTP – pór pro cytochrom c (permeability transition pore)
ASCT2	transportér glutaminu směrem do buňky
ATP, ADP	adenosintrifosfát, adenosindifosfát
Bak, Bax, Bad	proapoptotické proteiny z Bcl-2 rodiny
BCA	kyselina bicinchonová
Bcl-2	rodina proteinů, jejichž název je odvozen od „B-cell lymphoma“, kde byly poprvé identifikovány, regulují propustnost vnější mitochondriální membrány
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CDK4	cyklin-dependentní kinasa 4, reguluje vstup do S-fáze buněčného cyklu
CDKI	inhibitory cyklin-dependentních kinas
C-JUN, C-MYC	proliferační transkripční faktory (onkoproteiny)
C-MYC	regulační gen kódující transkripční faktor C-MYC
CoA	koenzym A
CREB	transkripční faktor regulovaný cAMP (cAMP response element-binding protein)
DHA	dihydroartemisinin
DISC	komplex smrti (Death-Inducing Signalling Complex)
E-box	palindromická sekvence DNA určená pro vazbu transkripčních faktorů (Enhancer box)
EGF	růstový faktor (Epidermal growth factor)
ER	endoplasmatické retikulum
ERK	extracelulárními signály regulovaná protein kinasa (Extracellular-signal-regulated kinase)
FADD	protein indukovaný FasR tvořící komplex smrti (Fas-Associated protein with Death Domain)
FasL	ligand receptoru apoptotické buněčné smrti
FasR	receptor apoptotické buněčné smrti (pro FasL)
FOXO	transkripční faktor z FOX rodiny, která je typická svou DNA vázající doménou (Forkhead box)
G-protein	protein vázající GDP/GTP
GLS	glutaminasa
GLUT1	gen pro glukosový transportér nezávislý na insulinu
GRB2	adaptorový protein vázaný N-terminální doménou na Sos faktor (Growth factor receptor-bound protein 2)
GSH	glutathion
GTP, GDP	guanosintrifosfát, guanosindifosfát
H2B	histon 2B
HIF-1	faktor indukovaný nedostatkem kyslíku (hypoxia-induced factor)
hnRNP	jaderné komplexy RNA s proteinem, které se účastní post-transkripčních modifikací pre-mRNA, neboli hnRNA (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins)
Hsp90	chaperonin o hmotnosti 90 kDa (heat-shock protein 90)
IFN- γ	interferon gama
IGF	insulinu podobné růstové faktory (Insulin-like Growth Factors)
IgG	imunoglobulin G
JNK	c-Jun N-terminální kinasa
LATS1,2	protein kinasy Hippo dráhy (large tumor supressor)
LDH	laktátdehydrogenasa
Max	protein tvořící dimer s MYC onkoproteinem, nezbytný pro jeho transkripční funkci

MEK	protein kinasa, součástí mitogeny aktivované protein kinasové kaskády (Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase)
Molt-4	lidská buněčná linie akutní lymfoblastické leukémie
MST1,2	serin/threoninové protein kinasy Hippo dráhy (mammalian STE20-like protein kinase)
mTOR	protein kinasa, cílová molekula antimitotyka Rapamycinu (mammalian Target Of Rapamycin)
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid
NF-κB	skupina transkripčních faktorů, které ovlivňují expresi genů důležitých pro imunitu
Noxa	proapoptotický protein z Bcl-2 rodiny (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)
OMMP	permeabilizační komplex vnější mitochondriální membrány (Outer Mitochondrial Membrane Permeabilisation)
p38	mitogeny aktivovaná protein kinasa
p53	tumorsupresorový transkripční faktor o hmotnosti 53 kDa
PARP1	poly(ADP-ribosyl)polymerasa 1 (NAD ⁺ :ADP-ribosyltransferasa), provádí polyADP-ribosylaci jaderných proteinů
PBS	fysiologický roztok pufrovaný fosfátem (phosphate buffered saline)
PDH	pyruvátdehydrogenasový komplex
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIDD	protein obsahující doménu smrti indukovaný proteinem p53 (p53 induced protein containing death domain)
Pim-2	kinasa podílející se na stabilizaci C-MYC onkoproteinu
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PKM	pyruvátkinasa
PTB	fosfotyrosinová vazná doména proteinu (phosphotyrosine binding domain)
PTEN	tumor supresorový gen, jeho produktem je protein fosfatasa (Phosphatase and tensin homolog)
Puma	proapoptotický protein z Bcl-2 rodiny (p53 upregulated modulator of apoptosis)
Raf	rodina protein kinas aktivovaných Ras proteinem
Ras	rodina malých GTP-vázajících proteinů, také p21 ^{ras}
RIP1	kinasa aktivovaná TLR (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1)
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RPLP0	gen pro lidský ribosomální protein P0 (human ribosomal protein large P0)
SET	komplex asociovaný s ER (endoplasmic reticulum-associated complex)
Shc	C-terminální SH doména GRB2 (Src Homology 2 domain)
SOS	faktor vyměňující guaninové nukleotidy na Ras proteinech (Son of Sevenless)
STE20	serin/threoninové kinasy regulující průběh buněčného cyklu, apoptosy a stresové odpovědi
TAZ	onkogen kódující transkripční faktor, jeden z hlavních cílů Hippo dráhy (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif)
TBS	fysiologický roztok pufrovaný Tris (Tris-buffered saline)
TLR	Toll-like receptor – receptor rozpoznávající patogenní efekторы
TNF-α	nádorový nekrotický faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)
TRIF	mediátorový protein indukovaný aktivací TLR obsahující TIR doménu (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β)
TSC1,2	inhibitory protein kinasy mTOR (Tuberous sclerosis protein)
TTBS	směs TBS (Tris-buffered saline) a Tween-20
UPR	signální dráhy indukované nahromaděním nesbalených proteinů (unfolded protein response)
YAP	onkogen kódující transkripční faktor, jeden z hlavních cílů Hippo dráhy (Yes-associated protein)

1. Teoretický úvod

1.1 APOPTOSA

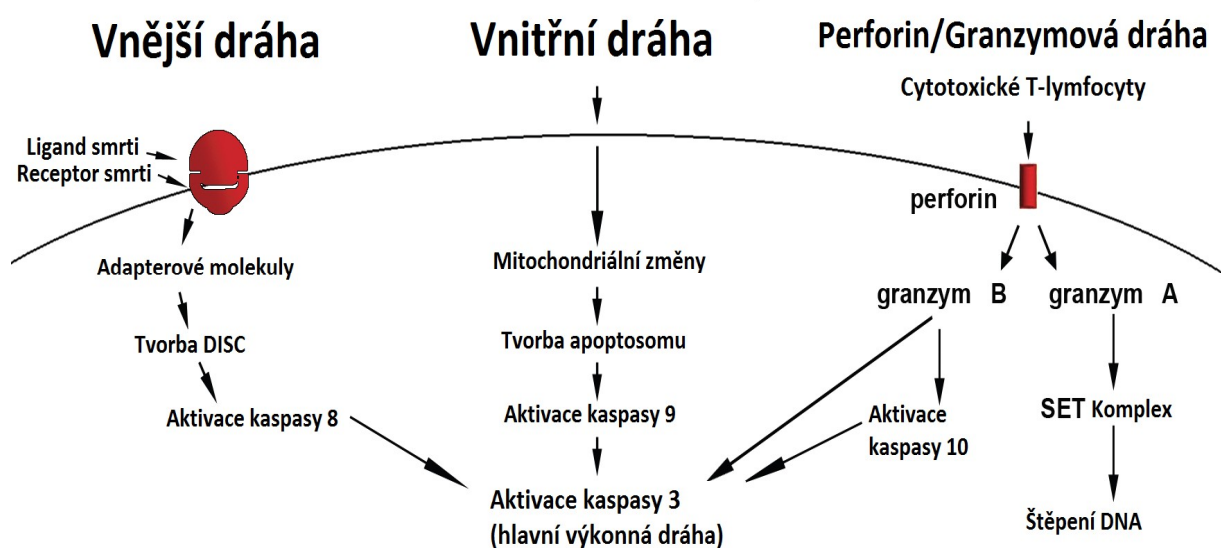
Programovaná buněčná smrt, neboli apoptosa, je evolučně konzervovaný fyziologický proces, během kterého dochází k charakteristickým změnám morfologie a následnému zániku buňky [1]. Apoptosa je aktivována buď přítomností stimulu (např. Fas ligand), nebo naopak nepřítomností stimulu (např. ztráta kontaktu s okolními buňkami) nebo činidlem potlačujícím tento stimul. Pokud je její spuštění znemožněno, může dojít k nekontrolovatelnému buněčnému růstu a následné tumorigenezi.

Charakteristickými procesy apoptosy jsou: kondenzace jaderného chromatinu, smršťování a oddělování cytoplazmy, zvětšení objemu endoplasmatického retikula a otočení polaritcy cytoplasmatické membrány. Apoptosa postihuje jednotlivé buňky a histologicky se projevuje tvorbou malých, kulatých nebo oválných cytoplasmatických fragmentů, z nichž některé mohou obsahovat pyknotické zbytky jádra. V játrech se někdy těmito útvarům říká Councilmanova tělíska, obecněji apoptotická tělíska [2]. Jádro umírající buňky prochází třemi stádii. Nejprve probíhá pyknosa (z řeckého slova *pyknono*, což znamená "zahustit se, uzavřít se nebo kondenzovat"), tedy nevratná kondenzace chromatinu. Poté následuje karyorrhexe, fragmentace jádra. Poslední fází je karyolýza, která je spíše důsledkem nekrózy, kdy dochází k úplné likvidaci chromatinu DNAsami. Při apoptose karyorrhexe pokračuje tvorbou apoptotických tělísek.

Apoptosa hraje značnou roli v homeostáze tkání. Jednotlivé umírající buňky jsou velmi rychle fagocytovány tkáňovými makrofágy, na rozdíl od fagocytózy viditelné při zánětu, kdy aktivované makrofágy putují do oblasti zánětu z okolních tkání. Pro buňky v konečném stádiu apoptosy je typická přítomnost specifických molekul na povrchu cytoplasmatické membrány, například fosfatidylserinu. Tyto molekuly jsou rozpoznávány tkáňovými makrofágy, které pro ně mají specifický receptor. Díky rychlé likvidaci obalených fragmentů nedochází k vylití buněčného obsahu a k poškození tkáně enzymy. Při apoptose tedy nedochází k zánětlivému procesu, na rozdíl od nekrozy [1].

1.1.1 Dráhy indukce apoptosy

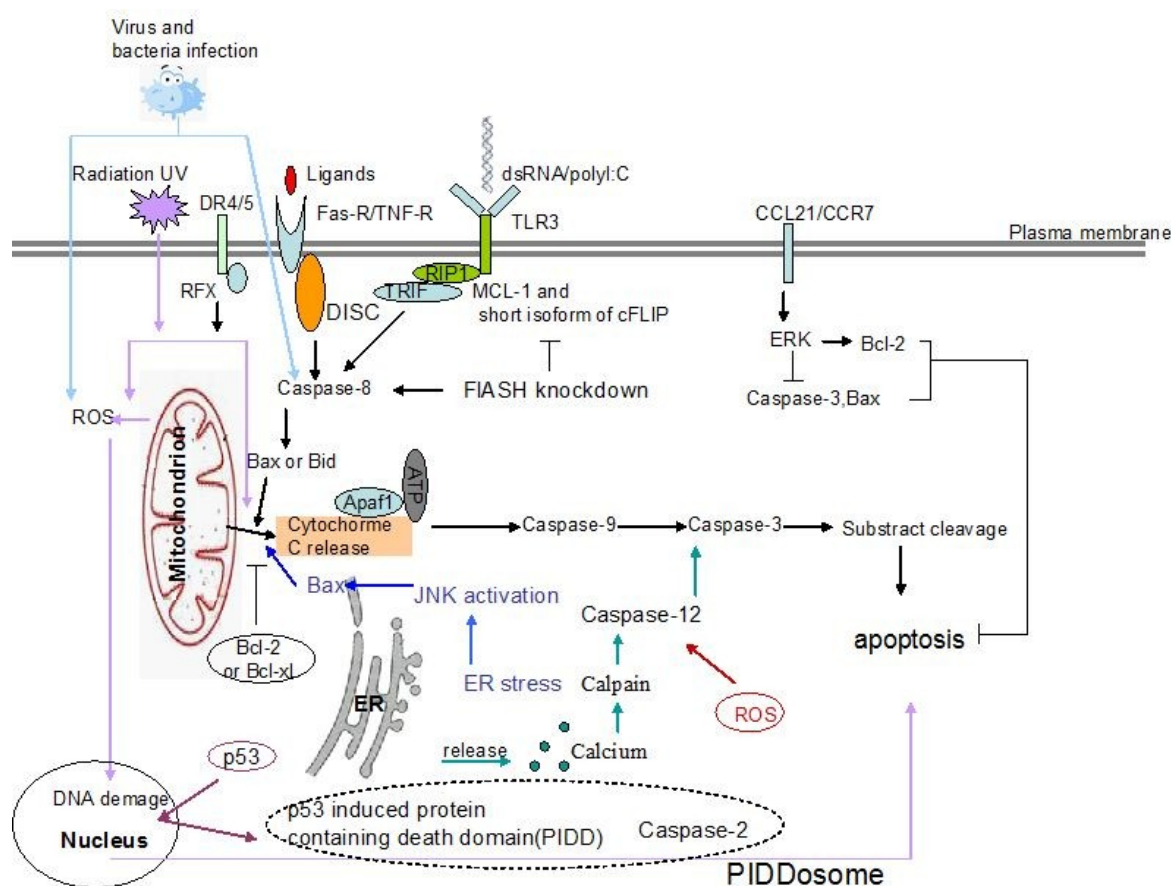
Apoptosa je aktivována složitými signálními dráhami a regulována množstvím vnitřních a vnějších signálních molekul. Existují tři základní dráhy indukce apoptosy (viz obr. 1), vnější – přes receptory smrti a vnitřní – mitochondriální; třetí, Perforin/Granzymová dráha, jde buď cestou přes kaspasu 10, nebo pomocí Granzymu A přímo do jádra, kde štěpí DNA, tedy nezávisle na kaspasách (viz obr. 3., str. 10). Signální dráhy se tedy také mohou rozlišit podle toho, jestli v nich vystupují kaspasy [3].



Obrázek 1.: Schématické znázornění apoptotických dějů, upraveno podle [4].

Dráhy závislé na kaspasách

Tyto dráhy jsou klasickými apoptotickými dráhami a figuruje v nich kaspasová kaskáda. Kaspasy jsou cysteinové proteasy vyskytující se jako neaktivní proenzymy (prokaspasy) a je nutná jejich aktivace. Kaspasy štěpí substrát vždy za aspartátem a vykazují tak vysokou substrátovou specifitu. Detailně je popsáno deset kaspas, a to iniciační (2, 8, 9, 10), efektorové (3, 6, 7) a zánětlivé kaspasy (1, 4, 5), další dodatečně identifikované jsou kaspasy 11 a 12. Receptory spřažené s kaspasovou dráhou jsou například TNF- α (tumor necrosis factor) receptor, Fas receptor, atd. Důležitým přenašečem signálu a regulačním prvkem buněčného růstu a smrti jsou Ca^{2+} ionty, proto je koncentrace vápníkových iontů v cytosolu a tím i osud buňky kontrolován otevíráním nebo zavíráním vápníkových kanálů. Na kaspasách jsou závislé vnější i vnitřní cesty indukce apoptosy (viz obr. 2, str. 9).



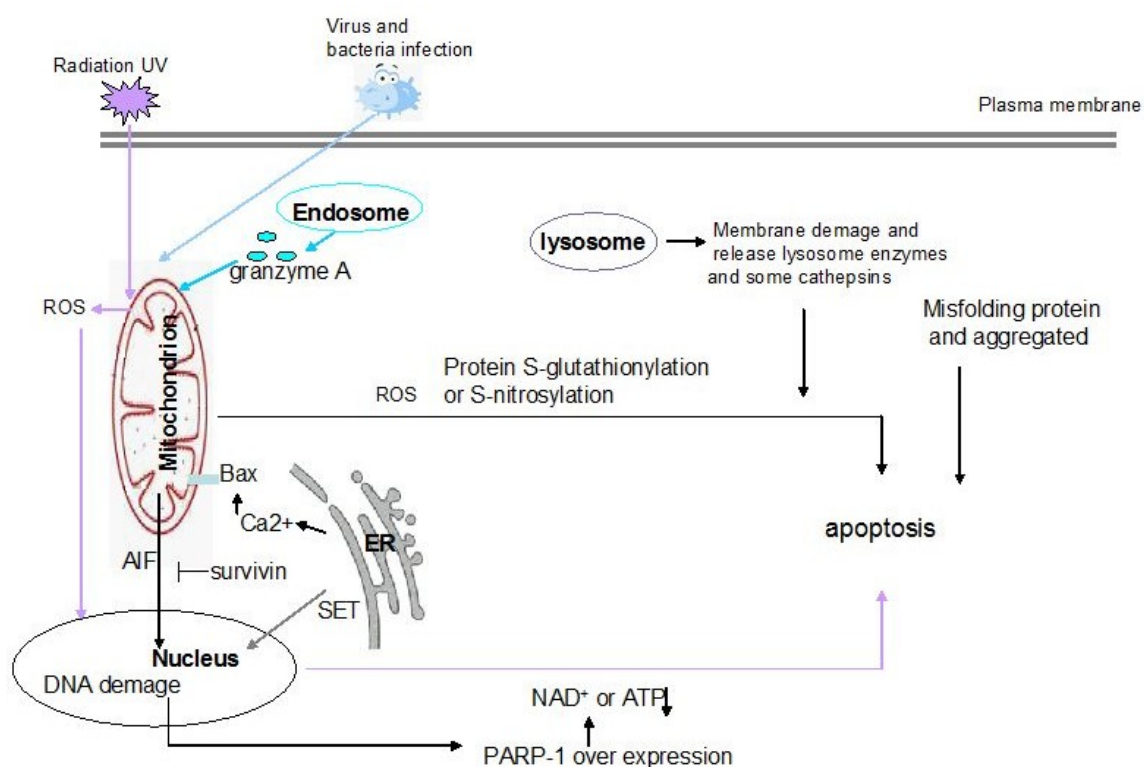
Obrázek 2.: Souhrn apoptotických signálních drah [3]. Vysvětlivky: ROS – Reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species), DISC – komplex smrti (Death-Inducing Signalling Complex), TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , aktivován TLR – Toll-like receptor – receptory rozpoznávající patogenní efektory), RIP1 – kinasa aktivovaná TLR (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1), PIDD (p53 induced protein containing death domain), ERK – extracelulárními signály regulovaná kinasa (Extracellular-signal-regulated kinase).

Dráha kaspasy 8 indukovaná ligandem TNF- α je závislá na TNF- α receptoru a aktivuje kaspasu 8 prostřednictvím DISC. Kaspasa 8 poté aktivuje přímo kaspasu 3 nebo protein z Bcl-2 rodiny, který může indukovat změny ve vnitřní mitochondriální membráně a stimulovat uvolnění cytochromu c (komplex ANT-VDAC-PTP, viz dále). Uvolnění cytochromu c je hlavním vnitřním proapoptotickým signálem, který aktivuje kaspasovou kaskádu až k hlavnímu efektoru apoptosy, kaspase 3. Také některé virové a bakteriální patogeny (např. herpesvirus) mohou aktivovat Fas receptor (FasR) a indukovat tvorbu komplexu smrti (FADD) a prostřednictvím kaspasy-8 indukovat apoptosu. Některé

patogeny mohou indukovat apoptosu prostřednictvím kaspasy-12 (např. makrofágy se apoptosou brání při infekci *Mycobacterium tuberculosis*) [3].

Dráha nezávislá na kaspasách

Jak je z názvu patrné, v této dráze nefigurují kaspasy. Prvním krokem je změna potenciálu mitochondriální membrány a zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species - ROS), které jsou hlavním faktorem indukujícím apoptosu nezávislou na kaspasách. Granzym A produkovaný cytotoxickými T-lymfocyty proniká pomocí perforinu přes buněčnou membránu a poté může přímo stimulovat vznik ROS a způsobit porušení mitochondrie nezávisle na kaspasách (viz obr. 1, str. 8). Cílová molekula granzymu A, komplex asociovaný s ER (SET komplex), putuje do jádra a přispívá k apoptose poškozením DNA (viz obr. 3) [5].



Obrázek 3.: Apoptotická dráha nezávislá na kaspasách [3]. Vysvětlivky: AIF - faktor indukující apoptosu nezávislou na kaspasách (Apoptosis-inducing factor), SET komplex (endoplasmic reticulum-associated complex), PARP-1 – poly(ADP-ribose)polymerasa 1.

Faktory spouštějící apoptosu

Vnější

- *Cytokiny*: Fungují jako chemoatraktanty a mediátory imunitní odpovědi. Obecně jsou cytokiny pozitivními induktory apoptosy. TNF- α , Fas ligand, IFN- γ (indukce apoptosy makrofágů závislá na NO, obrana před *Mycobacterium tuberculosis*).
- *Léčiva*: Některé cytotoxické látky, např. Cisplatina, Gemcitabin.
- *Hormony*: Hormony jsou zodpovědné za regulaci apoptosy během embryonálního vývoje. V dospělosti mohou ovlivňovat metabolismus tkání jak aktivací (glukokortikoidy, progesteron, thyroïdní hormony, estrogen), tak inhibicí (testosteron, estradiol, růstový hormon, leptin) apoptosy.
- *Patogenní efekторы*: Apoptosa je jedním z hlavních obranných mechanismů proti patogenům, např. *Mycobacterium tuberculosis* [6], *Chlamydia pneumoniae* [7], *Legionella pneumophila* [8].

Vnitřní

- *Oxidativní stres*: ROS (reaktivní formy kyslíku), které jsou zpravidla detoxikovány glutathionem (GSH), mohou poškodit buněčné struktury. Vyčerpání mitochondriálního glutathionu je zároveň časným signálem pro apoptosu, neboť buňka se bez glutathionu dostává do oxidativního stresu, který vede k apoptose [9].
- *Cytochrom c*: Jeho únik z mitochondrie do cytoplasmy je umožněn proteiny Bak/Bax. Bax a Bak spolu indukují tvorbu permeabilizačního komplexu OMMP (Outer Mitochondrial Membrane Permeabilisation) a následnou tvorbu póru, který umožňuje průchod cytochromu c a Ca^{2+} do cytosolu. Permeabilita mitochondriální membrány je ovlivnitelná řadou látek, které mohou přispět k tvorbě póru, např. kys. arachidonová, trijodthyronin a 6-hydroxydopamin.
- Ca^{2+} : Zvýšená koncentrace Ca^{2+} v mitochondrii podporuje oxidativní stres a tedy i permeabilitu membrány pro cytochrom c. Vápenaté ionty mohou také spustit stres endoplasmatického retikula a aktivovat JNK dráhu, která stimuluje aktivaci Bax proteinu. Tato aktivace cytochromu c je nezávislá na proteinu Bcl-2.

- *ER stres*: Stres endoplasmatického retikula (ER) je soubor všech možných vlivů, které vyvádějí endoplasmatické retikulum z homeostázy, což se projeví zejména hromaděním špatně sbalených proteinů. Jako odezva se spustí signální dráhy, které se souhrnně označují jako „unfolded protein response“ (UPR). Výsledkem je zpomalení translace mRNA, degradace špatně složených proteinů, zvýšení exprese chaperonových genů a udržení oxidativního prostředí v ER. V případě selhání regulačních mechanismů je spuštěna apoptosa [3].

1.2 ROLE BUNĚČNÉ SIGNALIZACE V TUMORGENEZI

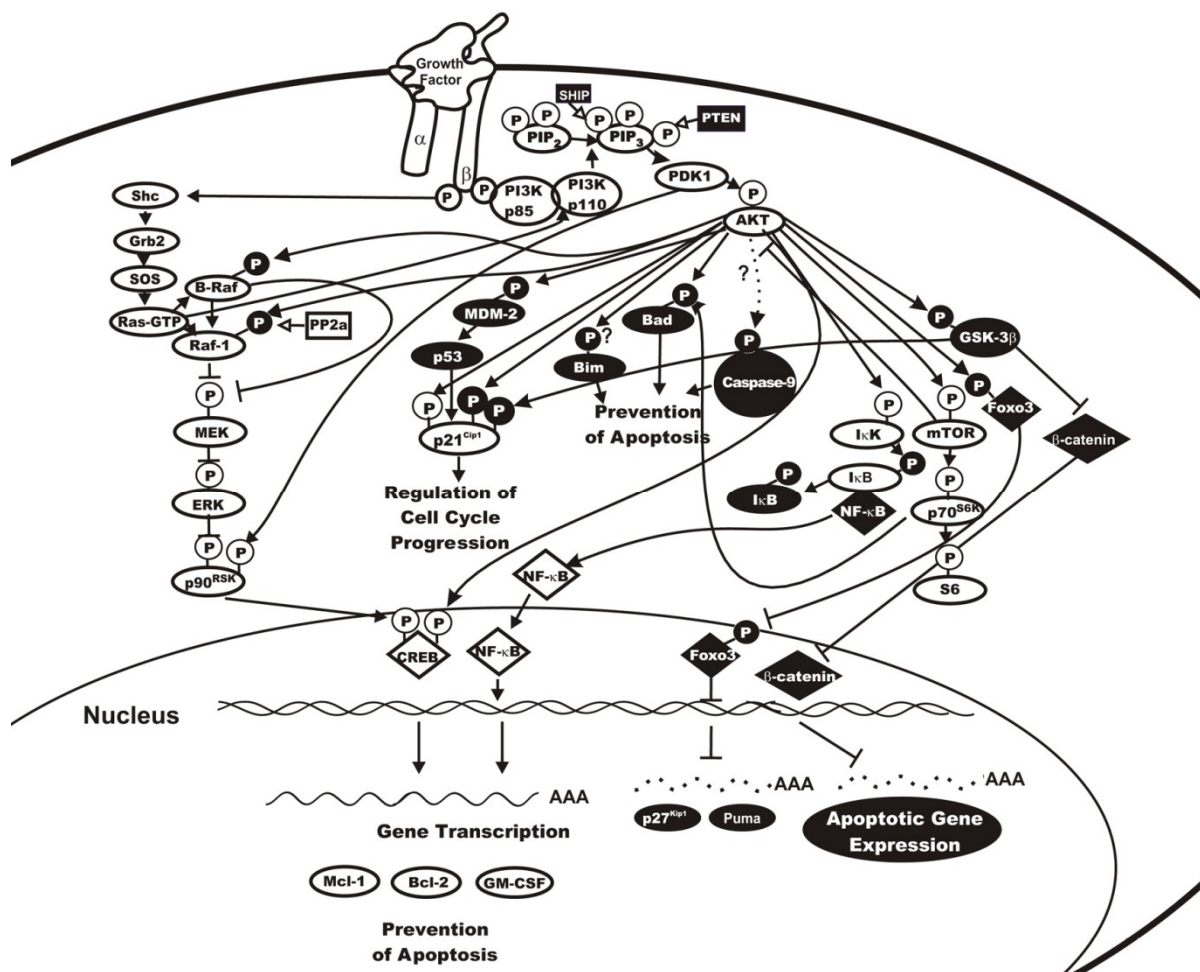
Buněčné signalizační dráhy jsou důležité pro porozumění nejen procesu tumorigeneze, ale také všem fyziologickým pochodům, jako jsou regulace buněčného růstu, smrti a migrace. Všechny tyto pochody jsou přísně kontrolovány různými intra- i extra-celulárními signálními molekulami. Při nádorovém bujení jsou tyto signální dráhy nadměrně stimulovány (v případě indukce proliferace a inhibice apoptosy), nebo naopak potlačeny (v případě indukce apoptosy). Tyto ztráty kontroly a regulace přenosu signálu dovolují nádorovým buňkám získat specifické vlastnosti, jako inhibice apoptosy, abnormální proliferace, stimulace angiogeneze a invaze do okolních tkání [10]. Zde jsou uvedeny dráhy, které mají na tumorigenezi největší vliv.

1.2.1 PI3K/Akt/FOXO

Akt kinasová dráha je klíčovou dráhou v procesu vývoje a karcinogeneze. Akt je serin/threoninová protein kinasa, která je regulována druhým poslem fosfatidylinositol trisfosfátem produkovaným fosfolipidovou kinasou fosfatidylinositol-3-kinasou (PI3K). PI3K může být aktivována receptory (např. růstových faktorů, insulinu) s tyrosin-kinasovou aktivitou, cytokinovými receptory, receptory spáženými s G-proteiny, B a T-buněčnými receptory a integriny. Aktivovaný receptor následně aktivuje PI3K interakcí regulační podjednotky PI3K p85 s komplexem receptor-substrát. Aktivovaná kinasa potom fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP3), který funguje jako druhý posel a aktivuje Akt kinasu [11].

Cílovými molekulami Akt kinasy jsou například Bad protein a transkripční faktory FoxO (Forkhead box O), (viz obr. 4, str. 14). Jejich fosforylace Akt kinasou inhibuje jejich aktivitu a kladně tak přispívá k přežití, růstu a proliferaci buňky.

FoxO, cílové transkripční faktory této dráhy, podporují inhibici růstu a apoptotickou signalizaci indukcí exprese proapoptotických proteinů z Bcl-2 rodiny, stimulací exprese ligandů receptorů smrti, jako například Fas ligand, nebo zvýšením hladin různých inhibitorů cyklin-dependentních kinas (CDKI). FoxO tedy vystupují jako tumor supresorové transkripční faktory. Pokud je jejich aktivita inhibována aktivitou PI3K/Akt dráhy, hromadí se v cytoplasmě v neaktivní fosforylované formě a nedochází k expresi cílových genů. Ve velkém počtu lidských nádorů jsou FoxO inaktivovány důsledkem přílišné aktivity PI3K/Akt dráhy, jejíž deregulace je důsledkem například mutací v genu *RAS*, *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog) nebo *PI3K* [11]. Ras je malý G-protein, který reguluje několik klíčových molekul jako například PI3K nebo Raf.



Obrázek 4.: Přehled PI3K/Akt dráhy a její spolupráce s Ras/Raf/MEK/ERK dráhou [12]. Vysvětlivky: PI3K - fosfatidylinositol-3-kinasa, PIP2 - fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, PIP3 - fosfatidylinositol-3,4,5,-trisfosfát, FOXO – Forkhead box O transkripční faktory, PTEN – protein fosfatasa, Ras-GTP – aktivovaný Ras G-protein, Shc - C-terminální SH doména GRB2, GRB2 - adaptorový protein vázaný N-terminální doménou na Sos faktor, SOS - faktor vyměňující guaninové nukleotidy na Ras, Raf – kinasa aktivovaná Ras-GTP proteinem, MEK – mitogeny aktivovaná protein kinasa, ERK - extracelulárními signály regulovaná kinasa, CREB - transkripční faktor regulovaný cAMP, mTOR – protein kinasa.

mTOR (mammalian Target Of Rapamycine) je vysokomolekulární protein kinasa. Její aktivita je regulována přítomností živin, cytokinů a rustových faktorů. Jedním z hlavních aktivátorů mTOR je Akt kinasa, která pozitivně reguluje mTOR jeho přímou fosforylací a také fosforylací (inaktivací) inhibitoru mTOR (např. TSC1 a TSC2). Hlavními cíli mTOR jsou komponenty translačního aparátu, konkrétně ty zodpovědné za vazbu mRNA na ribosom [13].

PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), působí jako fosfatidylinositol-3-fosfatasa a katalyzuje defosforylaci produktů PI3K, čímž negativně reguluje aktivitu PI3K/Akt dráhy a působí tedy tumor supresivně.

1.2.2 Ras/Raf/MEK/ERK

Růstové faktory a mitogeny předávají signál ze svých receptorů a prostřednictvím této dráhy regulují genovou expresi a zabraňují apoptose. Cílovými molekulami jsou transkripční faktory a apoptotické proteiny, tato dráha tedy podporuje proliferaci. V některých typech rakoviny jsou některé komponenty této dráhy často mutované nebo nadměrně exprimované (např. Ras, Raf), nebo jsou mutovány přímo geny kódující regulační receptory. Ras/Raf/MEK/ERK ve spolupráci s Ras/PI3K/PTEN/Akt dráhou regulují růst a proliferaci buňky a jejich deregulace často vede k tumorigenezi. Tyto dráhy společně mohou také interagovat s p53 dráhou a mohou tedy ovlivnit aktivitu např. Bax a Bak proteinů. Autokrinní aktivace exprese růstových faktorů indukovaná deregulovanou Raf kinasou, např. epidermálního růstového faktoru (EGF – epidermal growth factor), účinkuje jako stimulant růstu. Oxidativní stres (ROS) přímo aktivuje receptory růstových faktorů a inhibuje fosfatasovou aktivitu, může tedy také působit na tyto dráhy aktivačně [12].

Tato dráha má nejrůznější způsoby, kterými může regulovat průběh buněčného cyklu, apoptosu nebo diferenciaci buňky. Většina molekul souvisejících s touto dráhou (transkripční faktory, apoptotické regulační proteiny, kaspasy, kinasy) může být aktivována nebo inaktivována fosforylací. Apoptosa je v případě Ras/Raf/MEK/ERK regulována především fosforylací apoptotických regulačních proteinů, například Bad, kaspasy 9 nebo Bcl-2. Přehled dráhy viz obr. 5, str. 16.

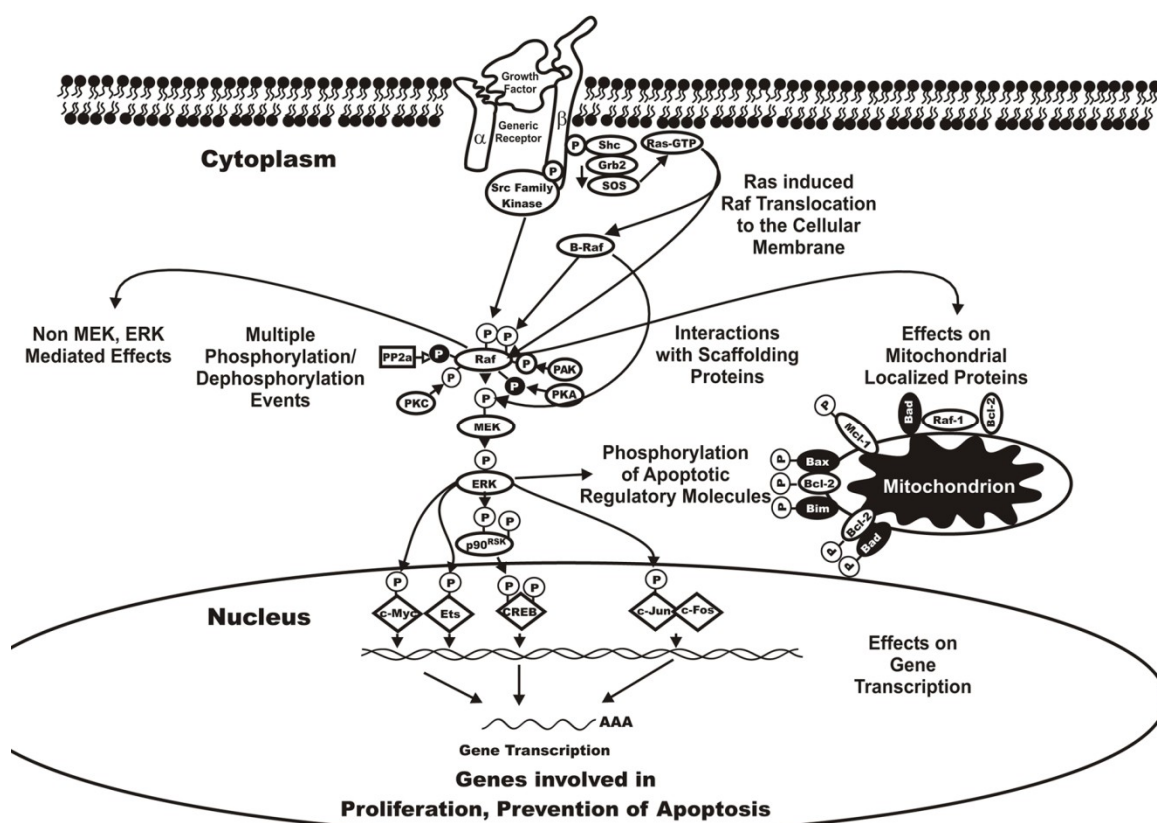
Ras, malý GTP vázající protein (G-protein), je společnou regulační molekulou několika signálních drah, například Raf a PI3K/Akt. Jsou známy 4 izoformy, které mají různou schopnost aktivovat tyto dráhy. Ras je aktivní pouze po navázání GTP, a jakožto malý G-protein nemá vlastní schopnost vyměnit GDP za GTP a potřebuje k tomu pomocné molekuly. Například po vazbě růstového faktoru, cytokinu nebo mitogenu na příslušný receptor je aktivován proteinový komplex Shc/GRB2/SOS, který dokáže stimulovat výměnu GDP za GTP na inaktivním Ras proteinu, který projde konformační změnou a

takto se aktivuje. Ras je lokalizován na plasmatické membráně a aktivuje kinasu Raf, která dále fosforyluje MEK.

Rodina proteinů Raf má velmi komplexní vícekrokový způsob aktivace, který je lokalizován v blízkosti cytoplasmatické membrány a sestává z dimerizace, fosforylace/defosforylace na regulačních místech Ras proteinem, asociace s proteinovým lešením nebo s chaperony a chaperoniny (Hsp90) [12].

MEK1 (Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase) je tyrosinová protein kinasa, která je aktivována fosforylací Raf kinasou. Její hlavní cílovou molekulou je ERK (Extracellular-signal-regulated kinase), která má několik cílových molekul (viz obr. 5, str. 16).

Jedním z hlavních cílových transkripčních faktorů této dráhy je C-MYC onkoprotein.



Obrázek 5.: Přehled Ras/Raf/MEK/ERK dráhy [12]. Vysvětlivky: Ras-GTP – aktivovaný Ras G-protein, Shc - C-terminální SH doména GRB2, GRB2 - adaptorový protein vázaný N-terminální doménou na Sos faktor, SOS - faktor vyměňující guaninové nukleotidy na Ras, Raf – kinasa aktivovaná Ras-GTP proteinem, MEK –

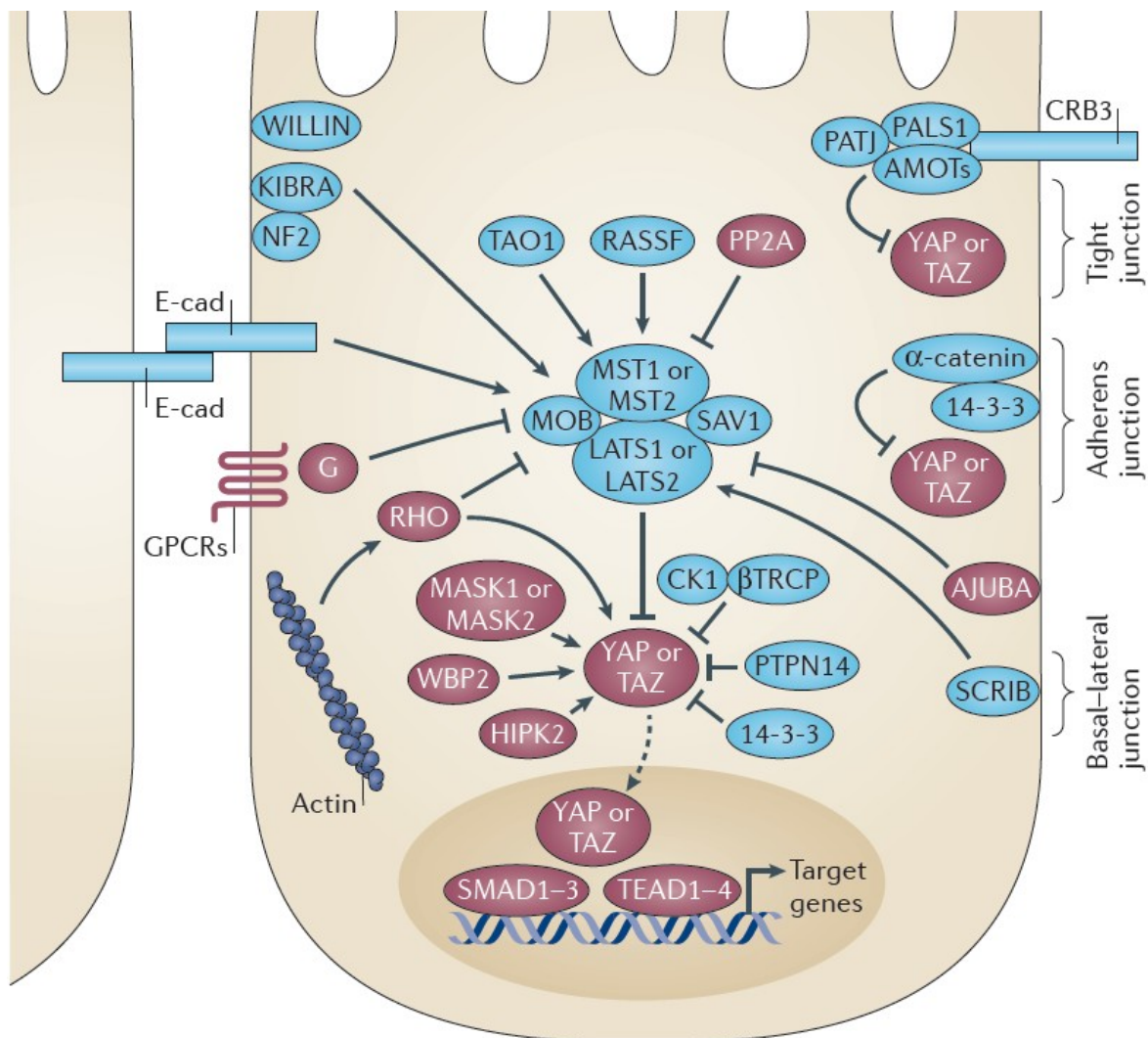
mitogeny aktivovaná protein kinasa, ERK - extracelulárními signály regulovaná kinasa, C-MYC, CREB, C-JUN, C-FOS – transkripční faktory.

1.2.3 Hippo dráha

Hippo dráha je evolučně zachovalý systém regulace růstu tkání a osudu buňky. Sestává z mnoha proteinů (zatím objeveno 35), které kontrolují růst tkání během vývoje a regenerace a také při tumorigenezi. Hippo dráha a její centrální tumor-supresorová kinasa Hippo byla poprvé objevena u *Drosophila melanogaster*. Centrem této dráhy u savců jsou dvě homologní serin/threoninové protein kinasy: MST1 (mammalian STE20-like protein kinase) a MST2, které spolupracují s LATS1 (Large tumor supressor) a LATS2 a několika pomocnými proteiny. Tyto proteiny limitují růst zprostředkováním fosforylace (a tím inaktivace) onkoproteinů YAP (Yes-associated protein) a TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif), která je závislá na LATS1 a 2 (přehled viz obr. 6, str. 18). Fosforylace těchto onkoproteinů způsobuje jejich hromadění v cytoplasmě a hromadnou ubiquitinylation, a tím potlačuje jejich aktivitu. Za normálních podmínek má tedy tato dráha tumor-supresorový účinek [14].

MST1 nebo 2 se v buňce běžně vyskytují ve formě homodimeru. Navíc mají štěpící místo pro kaspasu 3, neboť pro plnou aktivitu MST proteinu je nutná jeho proteolytická aktivace. Různé proapoptotické stimuly (např. aktivace FasR) mohou vést k odštěpení kinasové domény (36 kDa), která vstupuje přímo do jádra, na rozdíl od celého proteinu, který má jen omezenou schopnost přechodu přes jaderné póry a je převážně cytosolický. Důsledkem tohoto štěpení získává MST vyšší kinasovou aktivitu, protože je odstraněna autoinhibiční část molekuly a zůstává pouze katalytická podjednotka. Také tím získává jinou substrátovou specifitu – například ztrácí afinitu pro FOXO a získává afinitu pro histon H2B [15].

Bylo potvrzeno na rekombinantně připravených MST1/2, že spouští apoptosu přes p53 a JNK dráhy. Je možné, že aktivovaná kaspasa 3 přednostně štěpí už aktivované MST1/2 molekuly, ovšem mechanismus, kterým různé apoptotické induktory aktivují endogenní Mst1/2 není znám [16]. Také bylo pozorováno, že při deficienci MST1/2 kinas jsou nadměrně exprimovány geny pro C-MYC a cyklin E, což vede ke zvýšené proliferaci a následné tumorigenezi [17].



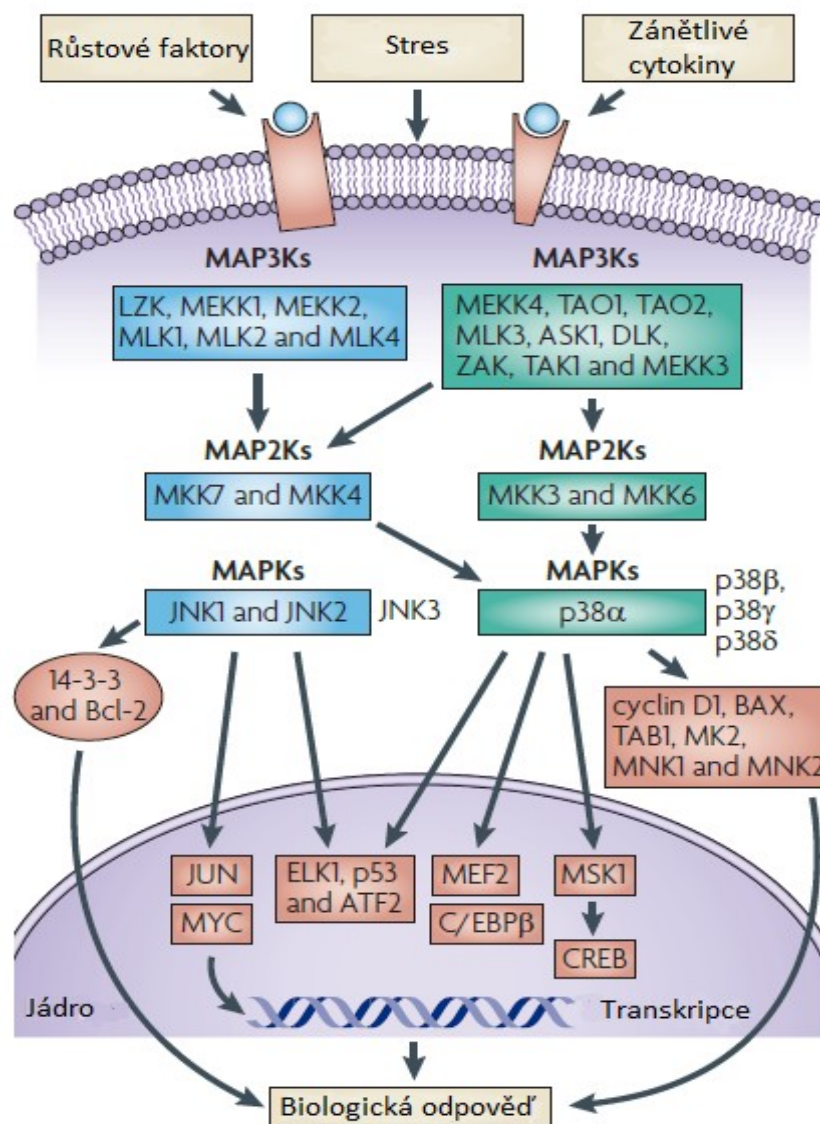
Obrázek 6.: Přehled Hippo dráhy. Červeně označené jsou onkoproteiny, modře tumor supresorové proteiny [14]. Vysvětlivky: GPCRs – receptory spřažené s G-proteinem, MST1/2 – protein kinasy, LATS1/2 – pomocné protein kinasy, YAP, TAZ – transkripční faktory.

1.2.4 JNK/p38 dráha

Mitogeny aktivované protein kinasy (MAPK) jsou signální komponenty, které převádějí extracelulární stimuly do velkého množství intracelulárních odpovědí. Bylo zjištěno, že například ERK1/2 MAPkinasy (MEK) jsou nadměrně aktivované v některých typech nádorových buněk a mohou tedy sloužit jako výhodné cíle terapeutického zásahu.

C-JUN N-terminální kinasa (JNK) a p38 MAPK, neboli stresově aktivované protein kinasové dráhy, propojují signály ovlivňující hlavně stresovou odpověď, ale také proliferaci, diferenciaci, přežití a migraci buněk a tím hrají i značnou roli v tumorigenezi. JNK a p38 mají normálně negativní efekt na proliferaci a přežití buňky. Nádorové buňky mohou také této signalizace využít pro podpoření své proliferace a invazivnosti, má tedy vlastnosti jak tumor-supresorové, tak onkogenní.

Hlavními cíli JNK rodiny jsou transkripční faktory FOS, JUN a MYC (viz obr. 7, str. 20). Onkogenní funkce JNK1 je hlavně založena na schopnosti fosforylovat a stabilizovat Jun (regulátor buněčného cyklu) a podpořit jeho transkripční funkci, což má značný pozitivní vliv na proliferaci, ale JNK2 je takto aktivní pouze ve stimulovaných buňkách. Naopak v nestimulovaných buňkách je více aktivní JNK1, jehož hlavní funkcí je označování Jun k degradaci. JNK mohou také fosforylovat a regulovat expresi několika členů Bcl-2 rodiny, jako například Bax a Bad, které mají proapoptotický účinek [18].



Obrázek 7.: Přehled JNK/p38 dráhy a jejích cílů, upraveno podle [18]. Vysvětlivky: JNK1/2 - C-JUN N-terminální kinasa, JUN, MYC, CREB – transkripční faktory, p38 – mitogeny aktivovaná protein kinasa.

1.3 METABOLICKÉ PŘEPROGRAMOVÁNÍ NÁDOROVÝCH BUNĚK

1.3.1 MYC

MYC je gen, který kóduje transkripční faktor MYC. Tento protoonkogen zásadně přispívá k rozvoji mnoha lidských nádorových onemocnění. V nádorových buňkách je *MYC* často nadměrně exprimován, tyto buňky se na MYC onkoproteinu stávají závislými [19]. To způsobuje deregulaci exprese dalších genů, z nichž některé ovlivňují proliferaci buňky,

vedoucí ji k transformaci na buňku iniciovanou až nádorovou. V lidském genomu je lokalizován na chromosomu 8 a pravděpodobně reguluje expresi až 15 % ze všech genů.

MYC dimerizuje s proteinem Max a váže cílovou sekvenci DNA obsahující tzv. E-box sekvence (Enhancer box), které mají sekvenci 5' CACGTG 3'. Je pravděpodobné, že po vazbě na DNA heterodimer MYC-Max interaguje s komplexy, které modifikují chromatin (např. histon-acetyltransferasa). C-MYC byl poprvé objeven u pacientů s Burkittovým lymfomem. Tyto nádorové buňky obsahovaly chromosomové translokace s častou translokací právě na 8. chromosomu. Gen, který byl získán naklonováním mutovaného místa, byl podobný myelocytomatosnímu virovému onkogenu (V-MYC), a protože byl buněčný, dostal název C-MYC („cellular“). Translace MYC mRNA je regulována miRNA (microRNA), samotný protein má poločas života 15 - 20 minut. Jeho transkripční aktivita je regulována fosforylací na serinu 62 a threoninu 58 [19].

U diferenciovaných buněk se vyskytuje cytoplasmatický štěpný produkt proteinu MYC, který neobsahuje jadernou lokalizační signální sekvenci ani DNA vázající doménu. Bylo objeveno, že tento štěp může podporovat acetylaci alfa-tubulinu a tím podporovat buněčnou diferenciaci bez zásahu do transkripce. MYC může také stimulovat DNA replikaci a translaci závislou na mRNA čepičce. Zároveň také reguluje buněčný růst regulací exprese miRNA. Studie dokazují, že MYC hraje kritickou roli ve zrání tkáňových kmenových buněk na buňky progenitorové [19].

Cílové geny tohoto transkripčního faktoru jsou převážně zodpovědné za energetický metabolismus (geny ovlivňující glykolysu, glutaminový metabolismus a mitochondriální biogeneze), regulaci buněčného cyklu (např. *CDK4*), metabolismus nukleotidů, syntézu ribosomů, zpracování RNA (hl. sestřih pre-mRNA) a replikaci DNA. Právě jeho funkce v syntéze ribosomů je pravděpodobně zodpovědná za často pozorovanou hypertrofii jadérka u nádorových buněk, jelikož syntéza rRNA je lokalizovaná v jadérku (nucleolus).

Za normálních podmínek může být MYC potlačen hypoxií prostřednictvím HIF-1 (hypoxia induced factor), naopak deregulovaná exprese *MYC* s HIF-1 spolupracuje na zvýšení exprese glykolytických genů. Tato spolupráce pravděpodobně přispívá k lepší adaptaci nádorových buněk na mírně hypoxické mikroklima nádoru [19].

1.3.2 Warburgův jev

Warburgův jev popisuje zásadní změnu v metabolismu nádorových buněk oproti buňkám zdravým. Nádorové buňky přeměňují během glykolysy glukosu až na laktát, který následně transportují ven z buňky [20]. V jejich metabolismu tedy mitochondrie vykazují nižší rychlost oxidativní fosforylace, což buňku chrání před volnými kyslíkovými radikály, které mohou přispívat k indukci apoptosy, také to ale může být důsledek hypoxie rychle rostoucího nádoru, ve kterém neproběhla angiogenese, takže jeho buňky nejsou dostatečně zásobeny kyslíkem. Jedním z hlavních důvodů ale je, že zpomalení respirace vede ke zrychlení glykolysy a tím ke tvorbě metabolických meziproductů, které jsou pak použity jako prekurzory pro anabolické dráhy (např. glyceraldehydfosfát do pentosového cyklu).

Pro nádorové buňky je typická inhibice apoptosy asociovaná s glykolysou, spočívající ve zvýšené expresi hexokinasy 2, která silně interaguje s mitochondriálním ANT-VDAC-PTP komplexem. Hexokinasa 2 lokalizovaná blízko ATP/ADP transportéru (ANT) efektivně využívá ATP jako substrát a zásobuje tak glykolysu. To má ovšem za následek odpuzování PTP (permeability transition pore) kanálu touto hexokinasou, což inhibuje uvolňování cytochromu c. Toto místo také obsahuje napěťově řízený aniontový kanál (VDAC) a další proteiny. Odpuzování PTP hexokinasou zmenšuje velikost póru, znemožňuje uvolnění cytochromu c, tím pádem se nemůže aktivovat kaspasová proteolytická kaskáda touto cestou [21].

Molekulární princip Warburgova jevu spočívá ve zvýšené expresi *C-MYC* genu, který je zodpovědný za metabolické přeprogramování nádorových buněk, zejména aktivací exprese *GLUT1* (glukosového transportéru), *LDH* (laktátdehydrogenasy) a utlumením aktivity *PKM1* (normální izoformy pyruvátkinasy) a *PDH* (pyruvátdehydrogenasového komplexu). *C-MYC* také zvyšuje expresi embryonální izoformy pyruvátkinasy (*PKM2*). Dále také aktivuje glutaminový metabolismus. Amplifikace, translokace nebo transkripční deregulace *C-MYC* je patrná téměř u všech nádorových buněk. Jeho aktivita je také pozitivně regulována proliferacími drahami, např. *RAS/RAF/MEK/ERK* [22].

Nádorové buňky exprimují ve zvýšené míře transportéry glutaminu (*ASCT2*) a glutaminasu (*GLS*) a tímto zvýšeným vychytáváním a zpracováváním glutaminu si zajišťují intermediáty Krebsova cyklu (citrát, 2-oxoglutarát) [23]. Díky tomu dochází ke kumulaci intermediátů glykolysy sloužících jako substráty pro syntézu nukleotidů a

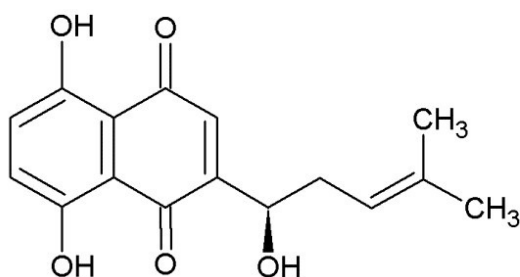
aminokyselin. Nádorová buňka může tyto intermediáty využít jen omezeně, hlavním mechanismem je zde dráha syntézy serinu, jejíž enzym fosfoglycerátdehydrogenasa má u nádorových buněk zvýšenou aktivitu. Nevyužité intermediáty jsou přeměněny na laktát nebo na glutamát (pomocí glutamátdehydrogenasy), což zajišťuje další doplnění NAD^+ pro glykolysu. V nádorových buňkách je také zvýšená aktivita citrát-synthasy, která kondenzuje acetyl-CoA z mobilizovaných lipidových zásob s oxalacetátem, zvyšuje se koncentrace citrátu a snižuje se koncentrace ketolátek. Hlavní příjem acetyl-CoA pochází z lipolysy a β -oxidace mastných kyselin, ale ne z pyruvátu [21].

GLUT1, LDHA, GLS i ASCT2 jsou regulovány na transkripční úrovni C-MYC onkoproteinem, *PKM2* je přednostně exprimována díky alternativnímu sestřihu řízenému C-MYC onkoproteinem. K alternativnímu sestřihu dochází vazbou PTB, hnRNP1 a hnRNP2 k PKM pre-mRNA (exprese těchto proteinů je regulována C-MYC). Dochází tak k odstranění exonu 9 (*PKM2*) při zvýšené pozitivní regulaci C-MYC, nebo exonu 10 (*PKM1*) normálně. *PKM2* je regulována vazbou peptidů s fosforylovaným tyrosinem, která způsobuje uvolnění alosterického aktivátoru fruktosa-1,6-bisfosfátu z regulačního místa a tím inhibici aktivity pyruvátkinasy, což umožňuje signálním drahám indukovaným růstovými faktory nasměrovat intermediáty glykolysy do biosyntetických procesů [24].

1.4 PŘÍRODNÍ LÁTKY JAKO INDUKTORY APOPTOSY NÁDOROVÝCH BUNĚK

1.4.1 Shikonin

Shikonin (R) a jeho optický izomer alkannin (S) byly používány po staletí v Orientu jako červené pigmenty a jako primitivní léčiva pro urychlení hojení ran a kožních chorob. Zdrojem shikoninu jsou především kořeny rostliny *Lithospermum erythrorhizon* (*Boraginaceae*). Shikonin je substituovaný 5,8-dihydroxy-1,4-naftochinon (naphthazarin) se šestiuhlíkatým postranním řetězcem (struktura viz obr. 8, str. 24).



Obrázek 8.: Struktura shikoninu.

Biologickými účinky shikoninu a alkanninu jsou hlavně: hojení ran (např. persistentních kožních vředů), protizánětlivé, protinádorové, antimikrobiální a antitrombotické vlastnosti. Zde budou probírány jejich protinádorové účinky.

Chinonové sloučeniny se obecně vyznačují cytotoxickými vlastnostmi. Shikonin a menší množství jeho jednoduchých derivátů dokázaly kompletně zastavit růst nádoru v myších (akutní lymfoidní leukémie) při dávce 5 - 10 mg/kg denně, ale při vyšších dávkách byl akutně toxický a při nižších naopak nebyl dostatečně aktivní. Nedávno bylo také zjištěno, že zatímco alkannin a shikonin indukují cytotoxickou aktivitu při vysokých koncentracích (100 µg/ml – 10 ng/ml), při extrémně nízkých koncentracích (10 ng/ml – 10 fg/ml) vykazují stimulační účinek *in vitro* na lidské granulocyty a lymfocyty. Komplexy naphthazarinů, včetně alkanninu, shikoninu a některých jejich derivátů s platinou vykazují podobnou protinádorovou aktivitu jako cisplatina, ale s nižší nefrotoxicitou. Komplexy shikoninu s mědí byly patentovány jako činidla štěpící DNA [25].

Je několik cest, kterými mohou chinony narušovat buněčné procesy. Jedním z nejčastěji navrhovaných mechanismů chinonové cytotoxicity je přes oxidativní stres, který je důsledkem schopnosti těchto látek vstupovat do redoxních cyklů. Například mohou podstoupit jednoelektronovou redukci pomocí NADPH:cytochrom-P450 reduktasy, čímž vzniká semichinonový radikál. Tento radikál je velmi reaktivní a snadno se může oxidovat v přítomnosti kyslíku zpět na chinonovou formu za uvolnění superoxidového aniont-radikálu. Tyto volné kyslíkové radikály, nebo i semichinonové radikály, mohou způsobit poškození buňky, což pravděpodobně přispívá k cytotoxicitě chinonů.

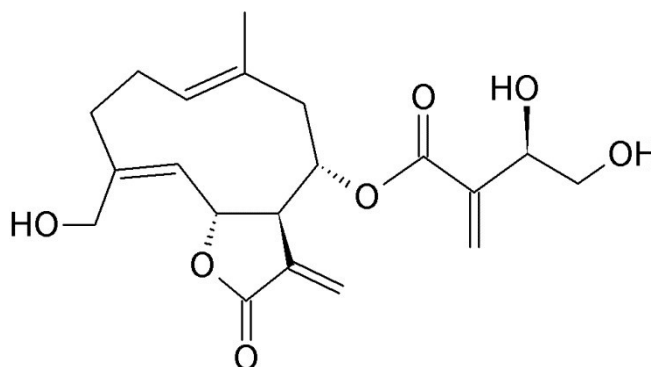
Základem dalšího navrženého mechanismu je elektrofilní povaha chinonů a jejich možné reakce s buněčnými nukleofily. Redukce chinonu *in vivo* způsobí eliminaci vhodně umístěné odstupující skupiny, což vytvoří silné alkylační činidlo. Tento elektrofil může

poté vychytávat buněčné nukleofily, jako například glutathion nebo DNA, což může eventuálně vyústit až v buněčnou smrt.

Dalším velmi pravděpodobným mechanismem cytotoxicity těchto látek je inhibice enzymů důležitých pro metabolismus nebo replikaci. Bylo dokázáno *in vitro*, že shikonin a jeho deriváty mohou silně interagovat s DNA topoisomerasami. Tyto enzymy kontrolují topologii DNA a upravují ji štěpením a spojováním vláken. Byla prokázána interakce jak s topoisomerasou I tak s topoisomerasou II. Interkalace shikoninu a jeho derivátů do dvojšroubovice DNA nebyla zjištěna [25].

1.4.2 Cnicin

Cnicin je seskviterpenový lakton se substituovanou kyselinou akrylovou navázanou esterovou vazbou (struktura viz obr. 9). Ve vysoké koncentraci se vyskytuje v listech *Cnicus benedictus* L. (*Asteraceae*) a listových trichomech *Centaurea maculosa* (*Asteraceae*).



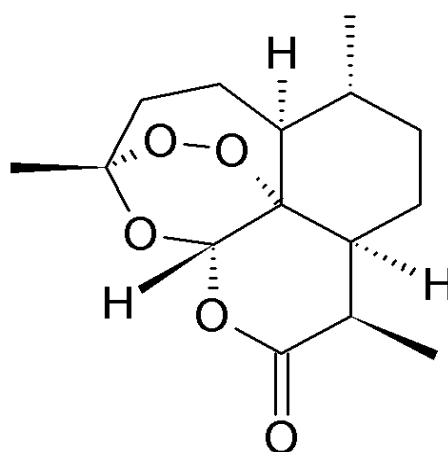
Cnicin konkrétně se vyznačuje antimikrobiálními a antineoplastickými účinky v nádorových buněčných liniích, blokuje proliferaci a indukuje apoptosu buněk mnohočetného myelomu. Bylo také dokázáno, že cnicin přednostně zabíjí buňky mnohočetného myelomu a jiných hematolignit (hlavně B-lymfocytární linie) před ostatními buňkami, působí tedy specificky.

Pro tuto práci je zajímavé působení cnicinu na Pim-2 kinasu. Pim-2 je transkripčně regulovaný mediátor signálů důležitých pro přežití buňky. Pim-2 účinkuje paralelně s PI3K/AKT/mTOR dráhou a významně se podílí na stabilizaci *C-MYC* onkogenu a přispívá tedy k přežití nádorů závislých na C-MYC onkoproteinu [26].

Pro efektivní léčbu je výhodné cnicin kombinovat s jinými chemoterapeutiky (např. melphalan – alkylační činidlo), na které působí potenciačně. Nádorové buňky (mnohočetný myelom) ošetřené cnicinem také vykazují jisté kompenzační mechanismy na úrovni mRNA a aktivaci několika proteinů důležitých pro přežití buňky (např. fosforylace Akt kinasu a p38 způsobená pravděpodobně akumulací ROS) [26].

1.4.3 Artemisinin

Artemisinin, přírodní látka izolovaná z *Artemisia annua* L. (*Asteraceae*), je široce využívána jako léčivo proti malárii (struktura viz obr. 10). Jedná se o seskviterpenový lakton obsahující endoperoxidový můstek.



Obrázek 10.: Struktura artemisininu.

Artemisinin a některé jeho deriváty, například dihydroartemisinin, atthemether a artesunát, mají silné antiparazitické a antimalarické účinky. Ukazuje se, že tyto deriváty mají také protinádorové účinky. Artemisininy také vykazují cytotoxickou aktivitu i proti resistantním nádorovým buňkám, což naznačuje, že působí jiným mechanismem než klasická léčiva [27]. Primární mechanismus protinádorového působení derivátů artemisininu je indukce apoptosy, zvýšení oxidativního stresu a inhibice angiogenese. Tyto mechanismy pravděpodobně souvisí s endoperoxidovým můstkem uvnitř molekuly, který může navázáním železa (ve formě volného Fe^{2+} , hemu, nebo obou) vytvořit toxický kyslíkový nebo hydroxidový radikál otevřením kruhu, ale také primární nebo sekundární radikál centrovaný na uhlíku [27]. Zajímavá je především jejich selektivita, která je pravděpodobně dána vysokou hladinou volného železa a také zvýšenou syntézou hemu v nádorových buňkách oproti buňkám zdravým. Například dihydroartemisinin (DHA) selektivně inhibuje růst Molt-4 lymfoblastů, ale je výrazně méně toxický pro normální lidské lymfocyty [28].

Studie v [28] dokázala, že artemisinin a jeho deriváty selektivně inhibují buněčný růst také buněk lidského hepatomu, a to nezávisle na stavu p53 (normální, mutovaný, nepřítomný). Artemisinin a DHA také zvyšují citlivost buněk hepatomu na gemcitabin, což indikuje jeho možné použití v kombinaci s některými chemoterapeutiky. Artemisinin a DHA rovněž způsobují zástavu v G1 fázi buněčného cyklu, snižují expresi cyklinů a CDK a zvyšují expresi apoptotických proteinů, čímž indukují apoptosu.

2. Cíl práce

Cílem práce bylo objasnění mechanismů působení vybraných přírodních látek na signalizaci a metabolismus nádorových buněk, a to zejména týkající se C-MYC onkoproteinu a aktivace Hippo dráhy.

3. Materiál a metody

3.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

3.1.1 Přístroje

- Kvantitativní PCR: iCycler iQ®5 Real-Time PCR *Bio-Rad, USA*
- Centrifuga PK110 s výkyvným rotorem O-G26 *ALC, USA*
- Centrifuga 5424R *Eppendorf, Německo*
- Centrifuga 5415R *Eppendorf, Německo*
- Centrifuga miniSpin *Eppendorf, Německo*
- Topné těleso *Grant, UK*
- Aparatura na SDS elektroforézu: Mini-Protean® Tetra System *Bio-Rad, USA*
SE260 Mighty Small Vertical Electrophoresis Unit *Hoefer, USA*
- Aparatura na přenos proteinů: Trans-Blot, Semi-dry *Bio-Rad, USA*
Semi Phor, Semi-dry transfer unit *Hoefer, USA*
- Kamera pro chemiluminiscenční detekci Lass 3000 *Fujifilm, Japonsko*
- Spektrofotometr Safire 2 *Tecan, Rakousko*
- Spektrofotometr NanoDrop 2000S *Thermo Scientific, USA*
- Spektrofotometr Synergy HT *BioTek, USA*
- Flowbox s laminárním prouděním MSC 12 *Jouan, Francie*
- Tkáňový inkubátor s CO₂ IGO 150 Cell Life *Jouan, Francie*
- Vortex V-1 plus *BioSan, Lotyšsko*
- Pipetovací nástavec Pipetus Akku *Hirschmann – laborgeräte, Německo*
- Automatické pipety + špičky: Rainin Pipet-Lite XLS *Mettler Toledo, Švýcarsko*
- Špičky s dvojitým filtrem dualfilter epTIPS *Eppendorf, Německo*
- plastové tkáňové kultivační lahve, plastové
jednorázové pipety, plastové zkumavky typu Falcon,
špičky na pipety, plastové mikrozukavky *TPP, Švýcarsko*

3.1.2 Materiál

- Nitrocelulosová membrána BioTrace® NT *Pall Life Sciences, USA*
- Reakční směs pro qPCR SsoFast EvaGreen® Supermix *Bio-Rad, USA*
- Primery: P0, C-MYC, GLUT1 *Metabion, Německo*

- Primární protilátky: C-MYC Rabbit Ab
MST1 Rabbit Ab *Cell Signaling, USA*
- Sekundární protilátka: Goat anti Rabbit IgG HRP *Santa Cruz laboratory, USA*
- Komerční kit na izolaci RNA: AurumTM Total RNA Mini Kit *Bio-Rad, USA*
- Komerční kit na reverzní transkripci a qPCR:
ProtoScript® M-MuLV Taq RT-PCR Kit *New England BioLabs, UK*
- Komerční kit na stanovení proteinů:
Pierce® BCA Protein Assay kit *Thermo Scientific, USA*
- Kultivační médium:
Bio WhittakerTM RPMI 1640 with L-Glutamine *Lonza, Švýcarsko*
- Standardy pro SDS elektroforézu:
Precision Plus Protein Standards *Bio-Rad, USA*

3.1.3 Chemikálie

- PBS (phosphate buffered saline) pufr 10× *Active Motif, USA*
- Inhibitory fosfatas (Phosphatase inhibitors) 20× *Active Motif, USA*
- Inhibitory proteas (Protease inhibitors) 50× *Roche, Švýcarsko*
- Lyzační pufr Total RNA Lysis Solution *Bio-Rad, USA*
- Tris *Fluka, Švýcarsko*
- NaCl *Fluka, Švýcarsko*
- NP-40 (nonyl phenoxypolyethoxylethanol) *Fluka, Švýcarsko*
- Deoxycholát sodný *Fluka, Švýcarsko*
- SDS (dodecylsírán sodný) *Roth, Německo*
- DMSO (dimethylsulfoxid) *Roth, Německo*
- Glycin *Roth, Německo*
- HCl *Sigma, USA*
- Tween 20 *Sigma, USA*
- Methanol *Lach-ner, ČR*
- 2-merkaptoethanol *Sigma, USA*
- Akrylamid 30% Acrylamide/Bis Solution 29:1 *Bio-Rad, USA*
- TEMED (Tetramethylethyldiamin) *Sigma, USA*
- Persulfát amonný *Sigma, USA*

- 30% peroxid vodíku *Sigma, USA*
- Kumarová kyselina *Sigma, USA*
- Luminol *Sigma, USA*
- Glycerol *Sigma, USA*
- Shikonin *Sigma, USA*
- Cnicin *PhytoLab, Německo*
- Artemisinin *Sigma, USA*
- Sušené odtučněné mléko Blotting-grade Blocker *Bio-Rad, USA*

3.2 METODY

3.2.1 Kultivace buněk

Práce byla prováděna s T-buněčnou leukemickou linií Jurkat [29]. Postupy zahrnující práci s buňkami v RPMI médiu obsahujícím antibiotikum a fetální hovězí sérum byly prováděny ve sterilním prostředí laminárního boxu pro zamezení kontaminace. Buňky procházely pasážováním (výměnou média a ředěním 1:10) třikrát týdně. Pro přípravu vzorků byl roztok s buňkami odstředěn ($400 \times g$, 4 min) a sediment byl resuspendován v čerstvém temperovaném médiu (37°C) a rozdělen do čistých popsanych lahví. K buňkám, které byly den před experimentem nasazeny na koncentraci 750 000/ml, byly přidávány přírodní látky, ke kontrolním pouze čistý DMSO (výsledné koncentrace přírodních látek viz tab. 1). Ošetřené buňky byly inkubovány při 37°C a $p\text{CO}_2$ 5,0 % po dobu 4 hodin. Po skončení inkubace se roztoky buněk opět odstředily ($400 \times g$, 4 min), supernatant odstranil a sediment resuspendoval v PBS pufru (objemy viz tabulka 1, $V_{\text{celkový}}$), poté byly roztoky rozděleny na frakci pro izolaci proteinů a frakci na izolaci RNA. Po čtyřhodinové kultivaci byl počet buněk přibližně 1 000 000/ml.

Tabulka 1.: Koncentrace přírodních látek v ošetřených buňkách, celkový objem po resuspendování v PBS pufru a objemy jednotlivých frakcí.

Kultivace	C_{shikonin} [$\mu\text{mol/l}$]	C_{cnicin} [$\mu\text{mol/l}$]	$C_{\text{artemisinin}}$ [$\mu\text{mol/l}$]	$V_{\text{celkový}}$ [ml]	$V_{\text{RNA-frakce}}$ [ml]	$V_{\text{prot.-frakce}}$ [ml]
1.	2,5	-	-	10	10	-
2.	1,0	10,0	20,0	12	3	9

3.2.2 Izolace RNA

RNA frakce byla odstředěna ($400 \times g$, 4 min) a buňky byly lyzovány 350 μ l Total RNA lyzačního pufru (Bio-Rad). Tyto lyzáty byly dále zpracovávány použitím materiálů z komerčního kitu a špiček s dvojitým filtrem, pro zamezení kontaminace vzorků RNAsami. Izolace byla provedena použitím komerčního kitu AurumTM Total RNA Mini Kit od výrobce Bio-Rad. Izolovaná RNA byla z kolonek eluována 70 μ l elučního pufru. Roztoky RNA byly zamraženy na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, pro další práci byly vždy ponechávány na ledu kvůli nízké stabilitě RNA.

3.2.3 Izolace proteinů

Proteinová frakce buněk byla odstředěna a k peletě byl přidán PBS pufr s fosfatasovými inhibitory skladovanými jako 20 \times koncentrovaný roztok (Active Motif). Následně byly roztoky buněk odstředěny ($400 \times g$, 4 min). K sedimentům bylo přidáno 150 μ l roztoku RIPA pufru (Radio Immuno Precipitation Assay) s inhibitory proteas (720 μ l RIPA pufru + 30 μ l proteasových inhibitorů Roche; RIPA pufr: 50mM Tris HCl (pH 8), 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% deoxycholát sodný, 0,1% SDS) a vzorky byly ponechány minimálně půl hodiny na ledu, při občasném promíchání na vortexu. Vzniklé precipitáty byly odstředěny při $14000 \times g$ po dobu 10 minut. Supernatanty byly přeneseny do čistých mikrozkušavek a zamraženy na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, pro další práci byly roztoky proteinů ponechávány na ledu.

3.2.4 Kvantifikace RNA

RNA byla kvantifikována spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000S (viz tab. 2, str. 34). Koncentrace RNA byla měřena při 260 nm, zároveň byla také měřena kontaminace proteiny (poměr absorbance 260/280 by měl být větší než 1,8, aby byl vzorek považován za čistý) nebo nízkomolekulárními látkami (poměr absorbance 260/230 by měl být větší než 1,8, aby byl vzorek považován za čistý).

3.2.5 Kvantifikace proteinů

Proteiny byly kvantifikovány BCA metodou. Pro stanovení byl použit komerční kit Pierce® BCA Protein Assay od výrobce Thermo Scientific. Jako standard byly použity roztoky BSA (hovězí sérový albumin) o koncentracích: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 μ g/ml a po inkubaci s činidly byla z naměřených hodnot absorbance při 562 nm sestavena kalibrační přímka (viz obr. 13, str. 37). Vzorky byly ředěné 5 \times a 10 \times ,

koncentrace proteinů v neředěných vzorcích byla vypočítána pomocí rovnice kalibrační přímky (viz tabulka 3, str. 38).

3.2.6 Reverzní transkripce

Po izolaci RNA z buněk a spektrofotometrické kvantifikaci byla provedena reverzní transkripce za použití komerčního kitu ProtoScript® M-MuLV *Taq* RT-PCR Kit (BioLabs). Reverzní transkripce byla provedena s 500 ng RNA. Reakční směs pro první část reverzní transkripce sestává ze směsi RNA s vodou, primeru oligo-dT a směsi dNTP. Tato směs byla zahřáta na 70 °C po dobu 5 minut. Poté byla dále udržována na ledu a byl k ní přidán pufr, inhibitory RNAs a reverzní transkriptasa. Tato reakční směs (celkový objem 20 µl) byla inkubována 1 hodinu při 42 °C, protože použitá reverzní transkriptasa má v této oblasti teplotní optimum. Po skončení inkubace byl enzym inaktivován vysokou teplotou (80 °C) po dobu 5 minut a vzorky byly zředěny 1:1 čistou destilovanou vodou. Výsledná zředěná cDNA byla poté použita do reakční směsi pro kvantitativní PCR.

3.2.7 Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (qPCR) se používá pro stanovení množství amplifikované DNA už během amplifikační reakce pomocí fluorescenčního barvení (real-time uspořádání, v reálném čase).

2 µl zředěné cDNA byly použity do reakční směsi spolu s 8,5 µl čisté destilované vody, 2 µl příslušného primeru (viz výsledky) a 12,5 µl komerční směsi SsoFast EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) obsahující DNA polymerasu (Sso7d-fusion polymerase), fluorescenční barvivo EvaGreen, směs dNTP a Mg²⁺ ionty. Celkový objem reakční směsi byl 25 µl a reakce probíhaly na mikrotitrační destičce (96 jamek) s nízkou autofluorescencí a přikryté folií pro zamezení odpařování vzorků.

Sekvence DNA primerů, použitých pro tuto práci, jsou:

- human ribosomal protein large *P0* (*RPLP0*),
forward: TCG ACA ATG GCA GCA TCT AC,
reverse: ATC CGT CTC CAC AGA CAA GG
- *C-MYC*, forward: TCG GAT TCT CTG CTC TCC TC
reverse: TCG GTT GTT GCT GAT CTG TC

Průběh qPCR se skládal z těchto kroků: **1.)** jeden cyklus – aktivace enzymu (denaturace inhibitoru), 30 s při 95 °C; **2.)** 40 cyklů – denaturace DNA (95 °C, 5 s), nasedání primerů a elongace (60 °C, 20 s); **3.)** měření křivky tání DNA, 61 kroků zvyšování teploty po 0,5 °C (65.0 °C - 95.0 °C), 10 s na jeden krok.

Kvantitativní PCR lze analyzovat dvěma způsoby, absolutní a relativní kvantifikací. Absolutní kvantifikace porovnává PCR fluorescenční signál se standardní křivkou, je tedy závislá na volbě standardu. Pro tuto práci byla použita relativní kvantifikace, která porovnává získaný signál cílového transkriptu ošetřené skupiny vzorků se signálem neošetřeného kontrolního vzorku. Metoda $2^{-\Delta\Delta C_T}$ je založena na měření C_T , což je počet cyklů, za který hodnota fluorescence dosáhla prahové hodnoty („threshold“). Měření byla prováděna v triplikátech, pro výpočet byly použity průměrné hodnoty C_T . První Δ udává rozdíl C_T cílového genu a C_T referenčního genu ($P0$ – gen kódující ribosomální protein P0) pro každý vzorek i kontrolu. Rozdíl těchto hodnot ΔC_T pro ošetřený vzorek a neošetřenou kontrolu (tedy $\Delta\Delta C_T$) udává rozdíl exprese mezi vzorkem a kontrolou pro cílový gen, normalizovaný na referenční gen. Celkovou procentuální změnu exprese udává vztah $2^{-\Delta\Delta C_T} \cdot 100\%$. [30]

Ukázkový výpočet: Referenční gen $P0$: $C_{T,K}$ (kontrola) = 19,16

$$C_{T,S} \text{ (shikonin)} = 19,16$$

$$\text{Gen } C\text{-MYC: } C_{T,K} = 27,82$$

$$C_{T,S} = 30,44$$

$$\Delta C_{T,K} = C_{T,K}(CMYC) - C_{T,K}(P0) = 27,82 - 19,16 = 8,66$$

$$\Delta C_{T,S} = C_{T,S}(CMYC) - C_{T,S}(P0) = 30,44 - 19,16 = 11,27$$

$$\Delta\Delta C_{T(S-K)} = \Delta C_{T,S} - \Delta C_{T,K} = 11,27 - 8,66 = 2,61$$

$$2^{-\Delta\Delta C_{T,S}} \cdot 100\% = 16,38 \%$$

Expres $C\text{-MYC}$ genu ve vzorku ošetřeném shikoninem je tedy 16,38 % oproti kontrole (100 %).

3.2.8 SDS elektroforéza

SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu byla provedena v uspořádání dle Laemmliho [31]. Použit byl 10% dělicí a 5% zaostřovací gel. Jako elektroodový pufr byl použit Tris-Glycinový pufr (25mM Tris, 190mM glycin, 0,1% SDS, pH 8,3). Vzorky proteinů byly naředěny RIPA pufrem tak, aby v jedné jamce bylo 40 µg proteinů. K vzorkům byl přidán redukující vzorkový pufr (4× koncentrovaný Laemmliho pufr: 2,4 ml 1M Tris pH 6,8, 0,8 g SDS, 4 ml 100% glycerolu, 0,02% bromfenolová modř, 1 ml merkaptoethanolu, 2,8 ml vody) a tyto směsi byly 5 minut inkubovány při 95 °C. Po nanesení vzorků a proteinového standardu (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad) na gel probíhala elektroforéza přibližně 1 hodinu, a to po dobu 20 minut zaostřování při 90 V a 40 minut dělení při 130 V.

3.2.9 Přenos a imunodetekce proteinů

Metoda tzv. přenosu (z angl. „blotting“) proteinů z akrylamidových gelů na nitrocelulosevé membrány se nazývá Western blot, dále jen přenos.

Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury, opláchnut v přenosovém pufru (25mM Tris, 192mM glycin, 20% v/v methanol) a umístěn na nitrocelulosevou membránu položenou na filtrační papíry navlhčené přenosovým pufrem v připravené aparatuře na polosuchý přenos. Gel byl poté opět převrstven navlhčenými filtračními papíry. Přenos probíhal přibližně 2 hodiny při stálém proudu 100 mA. Po dokončení přenosu byla membrána blokována v 5% roztoku odtučněného mléka v TTBS pufru (50mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% v/v Tween 20, pH 7,6) pro omezení nespecifické vazby protilátek.

Membrána byla ponechána v primární protilátce (králičí polyklonální IgG, antigen viz příslušné membrány) v 5% roztoku BSA v TTBS přes noc při 4 °C. Poté byla membrána 3 × 10 minut oplachována TTBS pufrem. Sekundární protilátka s navázanou křenovou peroxidase (kozí polyklonální IgG proti králičí IgG, antigenem je primární protilátka) v 1% roztoku mléka v TTBS byla s membránou inkubována přibližně 45 minut při laboratorní teplotě, poté byla membrána opět opláchnuta TTBS pufrem, 3 × 5 minut. Jako substrát pro chemiluminiscenční detekci aktivity křenové peroxidasy byla použita činidla: roztok A (10 ml 0,1M Tris pH 8,8 + 6,2 µl 30% H₂O₂) a roztok B (10 ml Luminolu + 44 µl kumarové kyseliny), těsně před detekcí byly roztoky A a B smíchány v poměru 1:1 a ve

vzniklé směsi byla opláchnuta membrána. Chemiluminiscence byla detekována přístrojem Lass 3000.

4. Výsledky

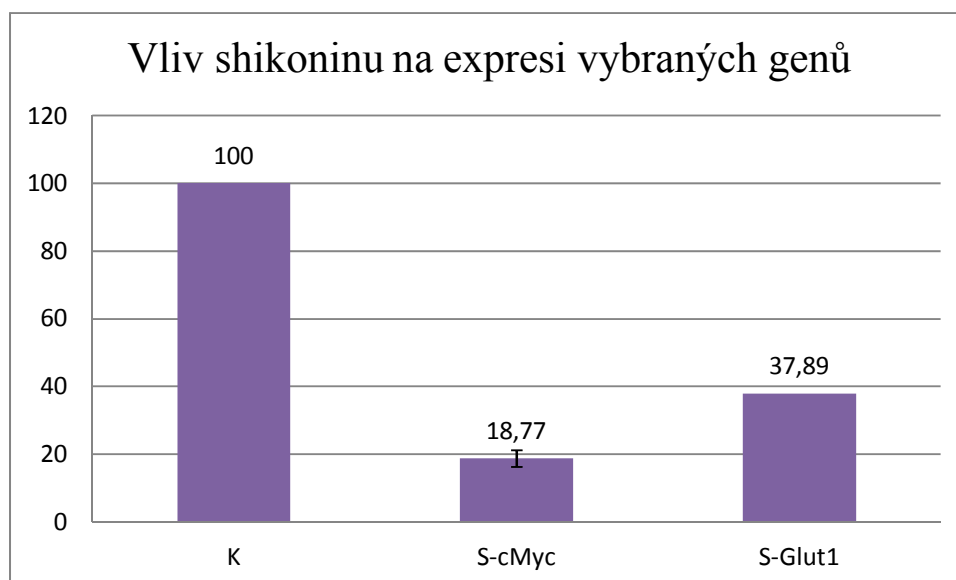
4.1 VLIV SHIKONINU NA EXPRESI VYBRANÝCH GENŮ

Pro reversní transkripci a následnou amplifikaci byla použita RNA izolovaná z buněčného materiálu, koncentrace a čistoty vzorků jsou popsány v tabulce 2.

Tabulka 2.: Kvantifikací RNA izolované z buněk byly získány tyto hodnoty. K značí vzorek z kontrolních buněk, S buněk ošetřených shikoninem. A_{260}/A_{280} vyjadřuje míru kontaminace proteiny, A_{260}/A_{230} míru kontaminace nízkomolekulárními látkami.

c _{RNA} (K) [ng/μl]	c _{RNA} (S) [ng/μl]	A_{260}/A_{280} (K;S)	A_{260}/A_{230} (K;S)
140,2	83,8	1,96; 1,94	1,78; 1,63

Výsledky z qPCR jsou zpracovány metodou $2^{-\Delta\Delta C_T}$ a změny v expresi sledovaných genů jsou porovnány s kontrolou, která představuje 100 % exprese.



Obrázek 11.: Změna exprese genů C-MYC a GLUT1 ve vzorcích ošetřených shikoninem (S) v porovnání s kontrolním vzorkem (K).

Na obrázku 11 (str. 35) je patrné výrazné snížení exprese genu *C-MYC* u vzorku ošetřeného shikoninem oproti kontrole. Také exprese *GLUT1*, který je typickým cílem transkripčního faktoru C-MYC kódujícím metabolický produkt, je snížena.

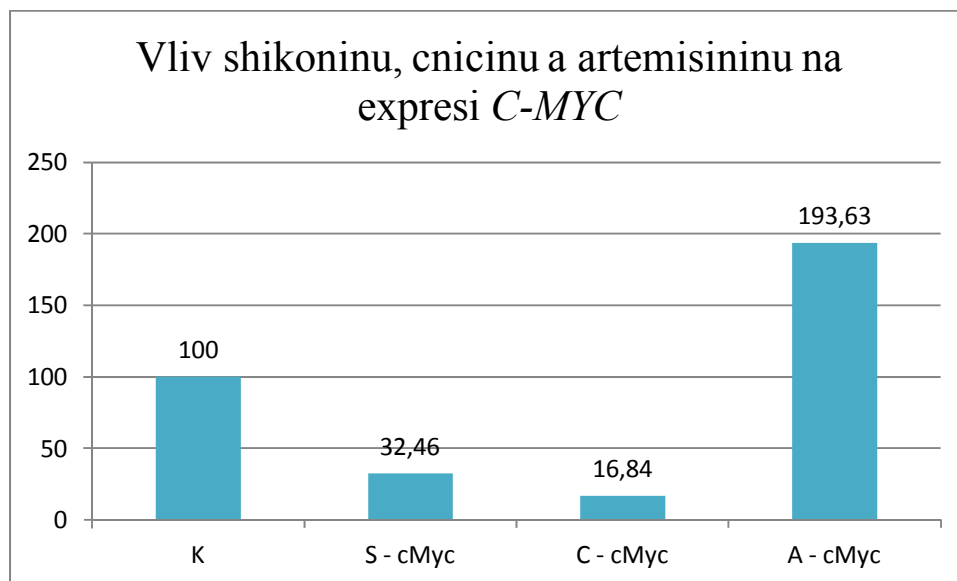
4.2 VLIV DALŠÍCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA EXPRESI VYBRANÝCH GENŮ

Koncentrace izolované RNA a její čistota ve vzorcích pro další měření viz tabulka 3.

Tabulka 3.: Kvantifikací RNA izolované z buněk byly získány tyto hodnoty. *K* značí vzorek z kontrolních buněk, *S* buněk ošetřených shikoninem, *C* cnicinem a *A* artemisininem. A_{260}/A_{280} vyjadřuje míru kontaminace proteiny, A_{260}/A_{230} míru kontaminace nízkomolekulárními látkami.

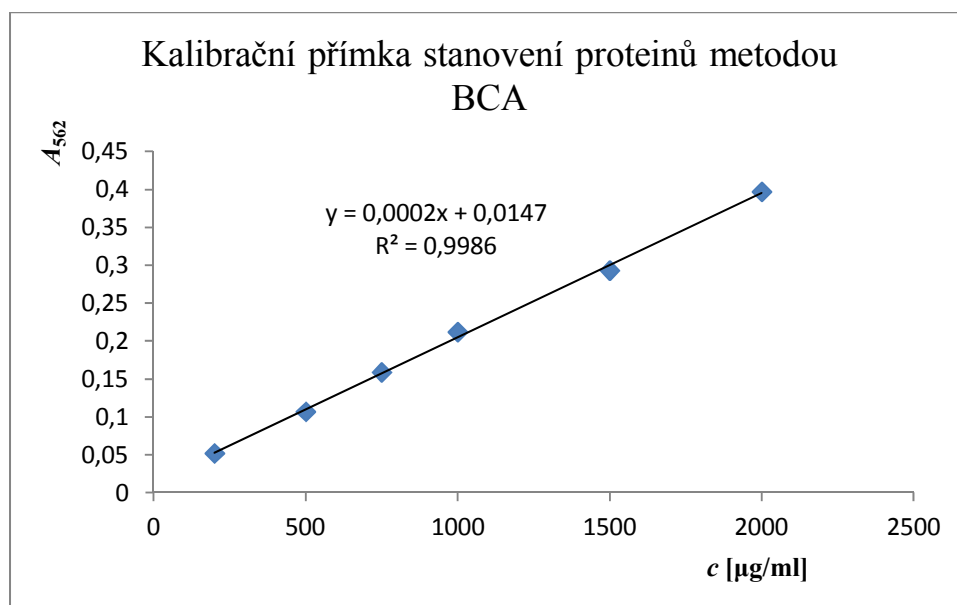
cRNA (K) [ng/μl]	cRNA (S) [ng/μl]	cRNA (C) [ng/μl]	cRNA (A) [ng/μl]	A₂₆₀/A₂₈₀ (K;S;C;A)	A₂₆₀/A₂₃₀ (K;S;C;A)
111,2	105,9	157,5	86,0	1,97; 1,94; 1,98; 1,93	1,91; 2,25; 1,83; 1,67

Další měření byla prováděna na vzorcích z buněk ošetřených shikoninem, cnicinem a artemisininem. Měření hladiny mRNA (viz obr. 12, str 37) potvrdilo snížení exprese *C-MYC* shikoninem i při nižší koncentraci (1μM). U vzorku ošetřeného cnicinem bylo výraznější snížení exprese (koncentrace cnicinu byla 10 μM, tedy 10× větší než shikoninu), naopak ve vzorku ošetřeném artemisininem se exprese zvýšila.



Obrázek 12.: Změna exprese genu C-MYC u vzorků ošetřených shikoninem (S), cnicinem (C) a artemisininem (A) v porovnání s kontrolním vzorkem (K).

Dále byla sledována hladina C-MYC a aktivace MST1 proteinů pomocí imunodetekce. Nejdříve bylo nutné stanovit množství proteinu v buněčném lyzátu. Pro kvantifikaci proteinů metodou BCA byla sestavena kalibrační přímka standardních roztoků proteinů o známé koncentraci (viz obr. 13) a pomocí rovnice přímky byly získány koncentrace proteinů ve vzorcích (viz tabulka 3, str. 38).

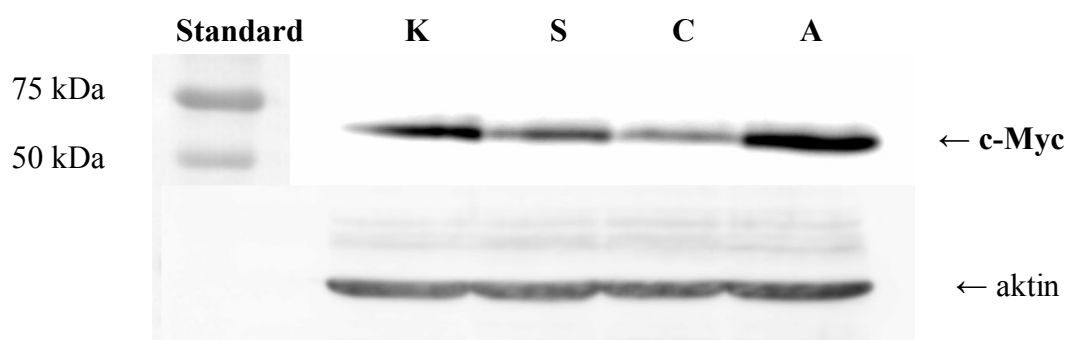


Obrázek 13.: Příklad kalibrační přímky pro stanovení celkové koncentrace proteinů metodou BCA.

Tabulka 3: Koncentrace celkových proteinů získané kvantifikací proteinů metodou BCA.

Vzorek	Kontrola	Shikonin	Cnicin	Artemisinin
$c_{\text{prot.}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$	14,37	12,01	12,67	13,37

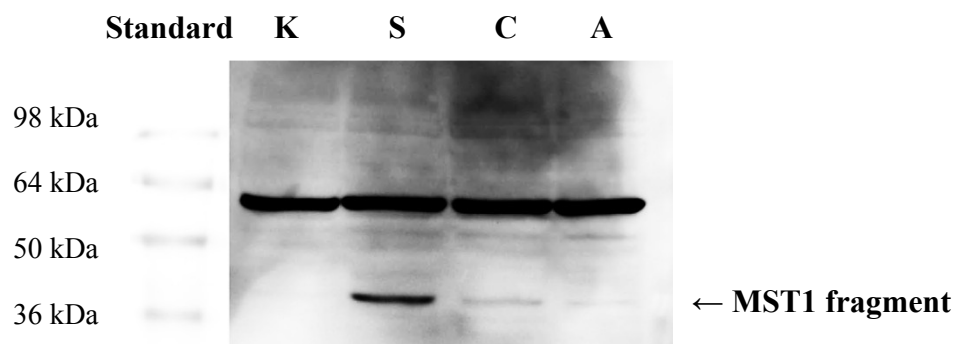
Pro vizualizaci a potvrzení změn v expresi byla využita metoda imunochemického značení a chemiluminiscenční detekce příslušných proteinových produktů sledovaných genů (*C-MYC*). Pro kontrolu nanášky byl vybrán aktin.



Obrázek 14.: Imunodetekce C-MYC proteinu ve vzorcích proteinů. Kontrolní vzorek - K, vzorek ošetřený shikoninem – S, cnicinem – C, artemisininem – A.

Na této membráně je viditelný pokles intenzity u vzorků proteinů ošetřených shikoninem a cnicinem, u artemisininu je intenzita naopak lehce zvýšená (viz obr. 14, str. 38). Ve spodní části je srovnání celkového množství naneseného proteinu, pro které se používá detekce aktinu.

4.3 AKTIVACE HIPPO DRÁHY PŘÍRODNÍMI LÁTKAMI



Obrázek 15.: *Imunodetekce MST1 kinasy ve vzorcích proteinů. Kontrolní vzorek – K, vzorek ošetřený shikoninem – S, cnicinem – C, artemisininem – A*

U vzorku z buněk ošetřených shikoninem je aktivní fragment MST1 jasně viditelný (viz obr. 15), tedy došlo k aktivaci MST1 kinasy. U vzorku z buněk s cnicinem je slabě viditelný a u vzorku z buněk s artemisininem není rozeznatelný od pozadí.

5. Diskuze

Výsledky měření provedených v první části práce dokazují, že přírodní látka shikonin působí na leukemické nádorové buňky snížením exprese genu *C-MYC* a tedy snížením produkce C-MYC onkoproteinu (viz obrázky 11, str. 35; 12, str. 37; 14, str. 38). To má za následek dramatické snížení proliferace a následnou indukci apoptosy důsledkem úplné metabolické závislosti nádorové buňky na produktech genů aktivovaných deregulovaným C-MYC onkoproteinem [19]. Je možné, že shikonin mimo jiné nespecificky inhibuje expresi genu *C-MYC* interakcí s DNA topoisomerasami a utlumením jeho transkripce modifikací chromatinu [25].

Imunodetekce MST1 kinasy ve vzorcích celkových proteinů ukázala, že shikonin také indukoval aktivaci a odštěpení katalytické podjednotky MST1, která byla pozorována jako fragment o molekulové hmotnosti přibližně 36 kDa (viz obr. 15). To naznačuje, že jedním z cílů MST1 by mohl být právě *C-MYC*, a že aktivovaný MST1 protein může inhibovat jeho expresi regulací některého z transkripčních faktorů. Toto tvrzení je podpořeno v [17], kde je zmíněno, že při deficienci MST1/2 je výrazně zvýšená produkce C-MYC a cyklinu E. Tato cesta působení shikoninu na expresi *C-MYC* onkogenu prostřednictvím Hippo dráhy je pravděpodobnější, protože je specifická.

Další výsledky, konkrétně z buněk ošetřených cnicinem, dokazují, že cnicin dramaticky snižuje expresi *C-MYC* genu a indukuje apoptosu. Toto snížení *C-MYC* onkoproteinu je způsobeno především inhibicí Pim-2 kinasy, která ho stabilizuje. Tyto výsledky se shodují s výsledky výzkumu účinků cnicinu na buňky mnohočetného myelomu v [26]. Na obrázku 15 (str. 39) je vidět, že cnicin zároveň slabě aktivuje MST1 kinasu, což může také přispívat ke snížení exprese *C-MYC*. Srovnání snížení exprese *C-MYC* genu mezi shikoninem a cnicinem naznačuje, že shikonin je účinnější, protože poskytuje výrazné snížení exprese už při koncentraci 1 μM , zatímco cnicin o koncentraci 10 μM vykazuje jen o málo větší snížení exprese než shikonin.

Buňky ošetřené artemisininem naopak vykazují zvýšení exprese *C-MYC* genu a produkce *C-MYC* proteinu. Zvýšení exprese *C-MYC* genu pozorované při amplifikaci je přibližně dvojnásobné, zvýšení množství *C-MYC* proteinu je ale pouze přibližně 1,5 \times , což je pravděpodobně způsobeno krátkou životností *C-MYC* proteinu (15 - 20 minut). Artemisinin také nezpůsobil aktivaci MST1 kinasy (viz obr. 15, str. 39). Tyto výsledky podporují teorii, že artemisinin indukuje apoptosu jiným mechanismem než např. shikonin nebo cnicin. Jeden z těchto mechanismů může představovat inhibice elektronového transportního řetězce narušením struktury hemových skupin [27]. Právě zvýšení exprese *C-MYC* by mohl být jeden z důvodů zvýšeného oxidativního stresu v buňkách vystavených účinku artemisininu, protože vysoká hladina *C-MYC* onkoproteinu vede ke zvýšení intenzity metabolismu, což u buněk s narušeným elektronovým transportním řetězcem může vést k akumulaci ROS.

Pozorované výsledky účinku těchto vybraných přírodních látek na nádorové buňky jsou velmi slibné pro další výzkum a vývoj cílené terapie nádorových onemocnění.

6. Závěr

Pozorované mechanismy účinku vybraných přírodních látek na nádorové buňky jsou tyto:

Shikonin:

- snižuje expresi *C-MYC*
- snižuje expresi *GLUT1*
- aktivuje MST1 kinasu

Cnicin:

- snižuje expresi *C-MYC*
- slabě aktivuje MST1 kinasu

Artemisinin:

- zvyšuje expresi *C-MYC*
- neaktivuje MST1 kinasu

Citovaná literatura

1. ALBERTS, B., et al. Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells. In: ALBERTS, B., et al. *Molecular Biology of the Cell (5th ed.)*. New York: Garland Science, 2008
2. KERR, J. F. R., A. H. WYLLIE a A. R. CURRIE. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972, s. 239–257
3. HONGMEI, Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review, kap. 1. In. *Apoptosis and Medicine*. 2012
4. ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35. 2007, s. 495-516
5. MARTINVALET, D., P. ZHU a J. LIEBERMAN. Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis. *Immunity*. 22(3). 2005, s. 355-370

6. HERBST, S., U. E. SCHAIBLE a B. E. SCHNEIDER. Interferon Gamma Activated Macrophages Kill Mycobacteria by Nitric Oxide Induced Apoptosis. *PLoS ONE*. 2011, č. 6
7. OLIVARES-ZAVALA, N., et al. Chlamydia pneumoniae Inhibits Activated Human T Lymphocyte Proliferation by the Induction of Apoptotic and Pyroptotic Pathways. *J Immunol*. 2011
8. NOGUEIRA, C. V., et al. Rapid Pathogen-Induced Apoptosis: A Mechanism Used by Dendritic Cells to Limit Intracellular Replication of Legionella pneumophila. *PLoS Pathog*. 2009
9. ARMSTRONG, J. S., et al. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. 2002, roč. 9.
10. YAJIMA, I. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt Signalling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatology Research and Practice*. 2011, č. 2012
11. ZHANG, X., T. J. HADDEN a A. K. RISHI. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011, č. 1813, s. 1978-1986
12. MCCUBREY, J. A. Roles of the Raf/MEK/ERK Pathway in Cell Growth, Malignant Transformation and Drug Resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007, č. 1773, s. 1263–1284
13. HAY, N. a N. SONENBERG. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*. 2004
14. HARVEY, K. F., X. ZHANG a D. M. THOMAS. The Hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews: Cancer*. 2013
15. ANAND, R., et al. Biochemical Analysis of MST1 Kinase: Elucidation of a C-Terminal Regulatory Region. *Biochemistry*. 2008
16. AVRUCH, J., D. ZHOU a J. FITAMANT. Protein kinases of the Hippo pathway: Regulation and substrates. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2012, č. 23, s. 770-784
17. ZHOU, D., et al. MST1 and MST2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *PNAS*. 2011

18. WAGNER, E. F. a Á. R. NEBREDÁ. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews: Cancer*. 2009, č. 9
19. DANG, C. V. MYC on the Path to Cancer. *Cell*. 2012
20. WARBURG, O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956, č. 123
21. ISRAËL, M. a L. SCHWARTZ. The metabolic advantage of tumor cells. *Molecular cancer*. 2011
22. VAN DER HEIDEN a THOMPSON. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009
23. WISE, D. R. a THOMPSON. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*. 2011
24. DAVID, C. J., et al. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*. 2010, č. 463
25. PAPAGEORGIOU, V. P. a K. C. NICOLAOU. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, č. 38, s. 270-300
26. JÖHRER, K., et al. Antimyeloma activity of the sesquiterpene lactone cnicin: impact on Pim-2 kinase as a novel therapeutic target. *J Mol Med*. 2012, č. 90, s. 681–693
27. O'NEILL, P. M., V. E. BARTON a S. A. WARD. The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin - The Debate Continues. *Molecules*. 2010
28. HOU, J., D. WANG a R. ZHANG. Experimental Therapy of Hepatoma with Artemisinin and Its Derivatives: In vitro and In vivo Activity, Chemosensitization and Mechanisms of Action. *Cancer Therapy: Preclinical*. 2008, č. 14
29. SCHNEIDER, U., H.U. SCHWENK a G. BORNKAMM. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*. 1977, č. 19
30. LIVAK, K. J. a T. D. SCHMITTGEN. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods*. 2001, č. 25, s. 402-408
31. LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970, č. 227

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka